

---

---

# Isolierung und Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern durch mikrobielle Oberflächenprä- sentation molekularer Bibliotheken

Dissertation

Björn Steinmann



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Clemens-Schöpf-Institut für  
Organische Chemie und Biochemie





# Isolierung und Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern durch mikrobielle Oberflächenprä- sentation molekularer Bibliotheken



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

**Clemens-Schöpf-Institut für  
Organische Chemie und Biochemie**

*Vom Fachbereich Chemie*

**der Technischen Universität Darmstadt**

**zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**genehmigte Dissertation vorgelegt von**

**Dipl. Biol. Björn Steinmann  
aus Weinheim**

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. Siegfried Neumann
Tag der Einreichung:	03. November 2014
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Dezember 2014

Darmstadt, 2015

D17

---

Dipl. Biol. Björn Steinmann  
Matrikelnummer: 1121713  
Studiengang: Promotion Chemie

Dissertation

Thema: „Isolierung und Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern durch mikrobielle Oberflächenpräsentation molekularer Bibliotheken“

Genehmigt:

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Kolmar am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von Juli 2009 bis August 2012 angefertigt.

---

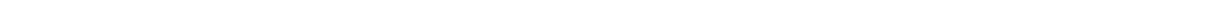




„Who are you to wave your finger? You must have been outta your head!“

Maynard James Keenan (TOOL)





---

## Publikationen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit veröffentlicht wurden

---

1. **Björn Steinmann**, Andreas Christmann, Tim Heiseler, Janine Fritz, and Harald Kolmar: In vivo enzyme immobilization by inclusion body display. *Appl Environ Microbiol* (2010), 76(16):5563-5569.
2. Sebastian Fabritz, Franziska Maaß, Olga Avrutina, Tim Heiseler, **Björn Steinmann**, and Harald Kolmar: A sensitive method for rapid detection of alkyl halides and dehalogenase activity using a multistep enzyme assay. *AMB Express* (2012), 2(1):51.
3. Stefan Zielonka, Niklas Weber, Stefan Becker, Achim Doerner, Andreas Christmann, Christine Christmann, Christina Uth, Janine Fritz, Elena Schäfer, **Björn Steinmann**, Martin Empting, Pia Ockelmann, Michael Lierz, and Harald Kolmar: Shark Attack: High affinity binding proteins derived from shark vNAR domains by stepwise in vitro affinity maturation. *J Biotechnol* (2014), DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.023.

---

## Tagungsbeiträge

---

4. **Björn Steinmann** (2012), *Poster*: "Isolation of VHH antibody fragments against various targets by screening a naïve library from *Lama glama* as an alternative to animal immunization", PEGS 2012, Boston (MA/USA).
5. **Björn Steinmann** (2011), *Kurzvortrag und Poster*: "Screening of a naive VHH antibody library from non-immunized *Lama glama* using phage and yeast display and isolation of binders against various targets", Molecular Life Sciences der GBM, Frankfurt am Main (DOI: 10.3288/contoo.paper.1589).
6. **Björn Steinmann** (2011), *Poster*: "Inclusion body display: in vivo protein immobilization for applications in biochemistry and biotechnology", Molecular Life Sciences der GBM, Frankfurt am Main (DOI: 10.3288/contoo.paper.1590).
7. **Björn Steinmann** (2011), *Vortrag*: "From the B Cell's RNA Code to the Surface of Yeast and Phage: To take Advantage of the Llama Immune System", 2<sup>nd</sup> Joint Merck Serono - TU Darmstadt Meeting on Yeast Display Technology, Nierstein.
8. **Björn Steinmann** (2010), *Vortrag*: "Llama (*Lama glama*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs)", 1<sup>st</sup> Joint Merck Serono - TU Darmstadt Meeting on Yeast Display Technology, Nierstein.

- 
9. **Björn Steinmann** (2009), *Poster*: “Towards ultra-high throughput screening for oxidase activity by bacterial and particle display”, 3<sup>rd</sup> European Conference on Chemistry in Life Sciences, Frankfurt am Main.

---

## Zusammenfassung

---

Die während dieser Doktorarbeit durchgeführten Studien sind im wesentlichen Bestandteil dreier Projekte. Die hier vorgelegte Dissertation behandelt das Projekt, für welches die intensivsten Studien betrieben wurden. Die beiden anderen Projekte wurden in Teilen bereits in Fachzeitschriften publiziert und werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

Das Hauptprojekt umfasst die Arbeiten zur Erstellung und Durchmusterung von kameliden VHH-Antikörperbibliotheken (*variable chain of a heavy-chain of a heavy-chain antibody*) aus *Lama glama* mittels Phagen- und Hefe-Oberflächenpräsentation. Dabei werden zunächst die Probenentnahme am Versuchstier, die Aufbereitung der Blutproben sowie die Extraktion der genetischen Information für das VHH-Antikörperrepertoire beschrieben. Durch Anwendung geeigneter Klonierungs- und Rekombinations-Methoden konnten daraus erfolgreich verschiedene VHH-Antikörper-Plattformen erstellt werden. Dabei wurde sowohl ein naives VHH-Repertoire aus einer Population von adulten Tieren, als auch ein durch Immunisierung affinitätsgereiftes Repertoire eines einzelnen Tieres eingesetzt und bezüglich ihres Potentials, antigenspezifische VHH-Antikörper isolieren zu können, untersucht. Beide Repertoires wurden in eine Hefe-Durchmusterungsplattform integriert und mehrfach erfolgreich nach Bindemolekülen durchmustert. Das naive Repertoire wurde zusätzlich für die Erstellung einer Phagen-Bibliothek eingesetzt und ebenfalls erfolgreich für die Durchmusterung in der Arbeitsgruppe von Prof. Kolmar eingesetzt.

Bei den eingesetzten Antigenen lag der Fokus auf Krebs-relevanten Proteinen (P-Cadherin, CD276, EGFR und EphA2), die potentiell für die Entwicklung von Krebstherapeutika in Frage kommen bzw. bereits genutzt wurden <sup>[1]–[4]</sup>. Daneben kamen Antigene zum Einsatz, die in Verbindung mit Malaria (Saglin) <sup>[5]</sup> oder rheumatischer Arthritis (HtrA1) <sup>[6]</sup> stehen.

Die Affinitäten ( $K_D$ ) isolierter VHH-Fragmente waren in der Regel eher moderat, was hauptsächlich an einer fehlenden Hochdurchsatz *screening* Plattform liegen dürfte, mit der man eine nötige große Anzahl an Einzelklonen analysieren könnte. Ein weiteres Optimierungskriterium stellt die eingeschränkte Möglichkeit zur zeitgleichen Markierung verschiedener Parameter im FACS dar, die zur genaueren Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung von Nöten ist. Im Falle des naiven VHH-Repertoires entsprachen die ermittelten Affinitäten isolierter Bindemoleküle jedoch durchaus den Erwartungen. Wie beispielsweise von Ghassabeh, Muyldermans und Saerens postuliert <sup>[7]</sup>, liegen die Affinitätskonstanten von VHH-Antikörpern aus naiven oder synthetischen Bibliotheken in der Regel im einstellig mikromolaren Bereich. Solche VHH-Fragmente sind unter anderem exzellente *scaffolds* für die *in vitro* oder *in vivo* Affinitätsreifung, aus der in einer anschließenden erneuten Durchmusterung Binder mit deutlich verbesserten Eigenschaften isoliert werden können.

Der Grad und die Geschwindigkeit der Anreicherung im Vergleich von naivem und affinitäts-gereiftem Repertoire waren erwartungsgemäß. Bei der Durchmusterung mit vergleichbaren Antigenkonzentrationen reichten mit der affinitätsgereiften Hefe-Bibliothek in der Regel ein bis zwei Durchmusterungsrunden im FACS, um eine deutliche Population erkennen zu kön-

nen. Mit dem naiven Repertoire waren in der Regel drei Runden nötig, um dasselbe Maß der Anreicherung zu erlangen.

Das zweite bearbeitete Projekt beschäftigte sich mit Studien zur Isolierung und Durchmusterung von VNAR Einzeldomänen-Antikörpern (*variable new antigen receptor*) aus dem Kleingefleckten Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*) und dem Weißgepunkteten Bambushai (*Chiloscyllium plagiosum*) und wurde im Rahmen einer Masterarbeit, die von Stefan Zielonka angefertigt wurde („Über die Identifizierung der genetischen Information der variablen Domäne des *novel antigen receptors* (IgNAR) von *Scyliorhinus canicula* und *Chiloscyllium plagiosum* sowie Untersuchungen zur Immunisierung von *Scyliorhinus canicula*“, 2011 <sup>[8]</sup>), durchgeführt. Als zurzeit kleinstes bekanntes Antikörperfragment zählt die variable Domäne der IgNAR-Antikörper (VNAR) als potente Alternative zu VHH-Antikörpern und anderen Antikörperfragmenten (scFv, Fab, VH, u.a.) mit hohem Potential für unterschiedliche Anwendungen im biochemischen und medizinischen Bereich <sup>[9]–[11]</sup>. Ihre kleine und kompakte Struktur ist eine ideale Voraussetzung für eine gute Gewebepenetration <sup>[9], [10]</sup>. Diese Moleküle wären somit bezüglich dieser Kriterien ideal für z. B. die Tumorthherapie. Ihre besondere stabile Bauweise verleiht ihnen außerdem exzellente Eigenschaften für die Verwendung in destabilisierenden Milieus. Im Vergleich zu konventionellen Antikörpern tolerieren sie höhere Konzentrationen an denaturierenden Agenzien sowie höhere Temperaturen <sup>[12], [13]</sup>.

Ein Teil dieses Projekts beschäftigte sich damit, die Isolierung und Amplifikation der variablen Domäne VNAR aus *Scyliorhinus canicula* sowie deren anschließenden Einsatz in einer Durchmusterungsplattform zu erforschen. Hierzu wurde die Tierhaltung, die Entnahme des Vollbluts und der Organe sowie die Extraktion der mRNA etabliert. Es war jedoch bislang nicht möglich geeignete Bedingungen zu definieren, um die bis dahin unbekannten VNAR-Sequenzen amplifizieren zu können. Neben der Verwendung des naiven VNAR-Repertoires, wurden sieben Tiere für eine Multiplex-Immunisierung mit acht unterschiedlichen Antigenen eingesetzt, um anschließend VNAR-Antikörperfragmente mit optimierten Eigenschaften isolieren zu können <sup>[14]</sup>. Bei den Antigenen handelte es sich ebenfalls wie im ersten Projekt hauptsächlich um Krebs-relevante Moleküle (P-Cadherin, CD276, EphA2, Hepsin und Matriptase <sup>[2]–[4], [15], [16]</sup>) sowie um Proteine, die mit Malaria (Saglin <sup>[5]</sup>) bzw. mit rheumatischer Arthritis (HtrA1 <sup>[6]</sup>) in Verbindung stehen. Außerdem wurde hier Lysozym als ein Kontrollprotein eingesetzt, da hiermit bereits eine erfolgreiche Immunisierung einer verwandten Hai Art (Ammenhai) beschrieben wurde <sup>[17]</sup>. Die Erforschung der immunstimulierenden Wirkung durch den Einsatz von komplettem Freundes Adjuvans (FCA) bzw. inkomplettem Freundes Adjuvans (IFA) war ebenfalls Teil des Versuchs <sup>[14]</sup>.

Aufgrund der bislang fehlenden Sequenzinformationen der VNAR-Gene, wurde zunächst die generelle Immunantwort, hervorgerufen durch die Immunisierung, untersucht. Hierfür wurden Messungen bezüglich der Antigenbindung durch die im Serum enthaltenen Antikörper mittels Bio-Layer Interferometrie und ELISA durchgeführt. Dabei wurden Blutproben von vier unterschiedlichen Zeitpunkten der Immunisierung untersucht, anhand derer eine generelle Zunahme der Immunantwort über die Zeit festgestellt werden konnte. Eine wirkliche Aussage

zum Vergleich der beiden Adjuvanzen FCA und IFA konnte bislang nicht gemacht werden. Zwar deuten erste Messungen darauf hin, dass eine stärkere Immunantwort durch die Verwendung von FCA hervorgerufen wurde, jedoch bleibt der Einfluss auf die Affinitäten der Antikörper bislang offen.

Der zweite Teil des Projekts beinhaltete die Isolierung der genetischen VNAR-Information aus dem Weißgepunkteten Bambushai (*Chiloscyllium plagiosum*) und die Erstellung einer naiven VNAR-Bibliothek in Hefen <sup>[18]</sup>. Dabei lag zunächst die Identifizierung von IgNAR-mRNA codierenden Geweben im Fokus (Masterarbeit Stefan Zielonka <sup>[8]</sup>). Basierend auf den Grundlagen dieser Arbeiten konnte in einem daran anschließenden Projekt von Stefan Zielonka eine semi-synthetische VNAR-Hefe-Bibliothek erstellt werden, die erfolgreich für die Durchmusterung und die Isolierung von Bindemolekülen eingesetzt wurde <sup>[19]</sup>. Durch *in vitro* Methoden zur Affinitätsreifung und Optimierung der zuvor isolierten VNAR-Antikörper und der Durchmusterung einer damit erstellten VNAR-Bibliothek in Hefen, konnten VNAR-Antikörper mit deutlich verbesserten Bindeeigenschaften isoliert werden. <sup>[19]</sup>.

Das dritte Projekt, das während dieser Doktorarbeit bearbeitet wurde, jedoch ebenfalls nachfolgend nicht weiter behandelt wird, beschäftigte sich mit der *in vivo* Immobilisierung von Enzymen auf Proteineinschlusskörpern. Initiale Arbeiten zum sogenannten *particle display* wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Björn Steinmann: „Intrazelluläre Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche von Protein-Einschlusskörpern“, 2009 <sup>[20]</sup>) durchgeführt und während der Dissertation in Form von eigenen Arbeiten sowie im Rahmen einer betreuten Diplomarbeit von Franziska Maaß („*In vivo* Immobilisierung von Enzymen und deren Einsatz für gekoppelte Enzymreaktionen von biotechnologischer Relevanz“, 2010 <sup>[21]</sup>) intensiviert. Im ersten Teil dieses Projekts wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, in *Escherichia coli* homogene Protein-Einschlusskörper bestehend aus einer Poly-3-hydroxybutyrat-Synthase (PhaC aus *Cupriavidus necator*) zu erzeugen, auf deren Oberfläche gezielt Enzyme immobilisiert werden können. Diese Immobilisierung erfolgt durch eine spezifische Wechselwirkung zweier *coiled-coil* Helices, die jeweils mit der PHB-Synthase bzw. mit dem zu immobilisierenden Enzym fusioniert sind. Das hierbei verwendete Modellenzym Galaktoseoxidase (GOase M1 <sup>[22], [23]</sup>) konnte nach Zellaufschluss anhand seines Substratsatzes auf den Partikeln nachgewiesen und analysiert werden. Die Immobilisierung machte es zudem möglich, einfache Pufferwechsel durch simples Zentrifugieren durchzuführen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser enzymaktiven Partikel wurde erfolgreich im Durchflussszytometer etabliert. Genauso wie Bakterien- oder Hefezellen können diese nach Markierung fluoreszenzaktiviert und durchflussszytometrisch analysiert sowie sortiert werden. Somit stellt diese Art der Immobilisierung eine vielseitige Methode dar, um anschließende enzymbasierte Anwendungen einfach durchzuführen, ohne aufwändige Anstrengungen für Pufferwechsel oder das Aufbringen von Proteinen betreiben zu müssen. Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit wurden ebenfalls publiziert <sup>[24]</sup>.

In weiteren Studien konnten gekoppelte Enzymreaktionen auf Partikeln unter Verwendung einer Alkoholdehydrogenase (ADH-RE aus *Rhodococcus erythropolis*) sowie eine Formiatde-

hydrogenase (CbFDH aus *Candida boidinii*) erreicht werden. Die beiden Enzyme konnten jeweils auf Partikeln immobilisiert und nach späterer Zusammenführung für die Generierung von Alkoholen unter gleichzeitiger Regeneration des Cofaktors NADH genutzt werden <sup>[21]</sup>. Ein letzter Ansatz sah vor, die Haloalkan-Dehydrogenase (DhaA) aus *Rhodococcus erythropolis* auf den Partikeln zu immobilisieren, um den Einsatz bei der Umsetzung von (3-Chloropropyl)triethoxysalin (Vorstufe von Octakis(3-chloropropyl)-POSS) zu 3-(Triethoxysilyl)propan-1-ol technisch durch die Immobilisierung auf fester Phase deutlich zu vereinfachen und das Protein zudem nach erfolgtem Substratumsatz aus dem Reaktionsgemisch durch simples zentrifugieren zu entfernen. Die Immobilisierung konnte dabei erfolgreich gezeigt werden, die Hydrolysierung des (3-Chloropropyl)triethoxysalin aber nicht. Jedoch konnte das Enzym in der Arbeitsgruppe von Prof. Kolmar in einem anderen Ansatz in seiner löslichen Form eingesetzt werden, um die Umsetzung von Haloalkanen zu den korrespondierenden Alkoholen sensitiv und schnell nachzuweisen <sup>[25]</sup>.



---

## Danksagung

---

Den folgenden Personen gilt mein aufrichtiger Dank:

Meinem Doktorvater, **Prof. Dr. Harald Kolmar**, möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion und den Platz in seiner Arbeitsgruppe danken. Auch wenn die Zeit nicht immer ohne Hürden war, so wurden doch immer alle Projekte intensiv vorangebracht und umso mehr schätze ich nun unser Verhältnis. Ich danke Dir und hoffe auch zukünftig auf einen gemeinsamen Burger mit Bier am Rande von wissenschaftlichen Tagungen!

**Prof. Dr. Siegfried Neumann**, möchte ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern vor allem für die immer großartigen Ratschläge während und nach meiner Zeit an der TUD danken. Sie haben mich immer bestärkt und mir oft die richtige Richtung gezeigt.

**Prof. Dr. Paul G. Layer** und **Prof. Dr. H. Ulrich Göringer** danke ich, dass sie als Prüfer zur Verfügung standen. Des Weiteren danke ich Ihnen für ihre Wegbereitung während des Studiums und für den positiven Einfluss, den Sie unbewusst auf meine wissenschaftliche Zukunft ausübten.

Diese Dissertation wäre ohne meine Eltern **Dagmar** und **Frank Steinmann** nicht möglich gewesen. Ihr habt mich immer unterstützt, mir das Studium ermöglicht und wart immer da, wenn ich euch gebraucht habe!

Für die tägliche Unterstützung und das Aushalten meiner Launen in den besonders stressigen Phasen der Doppelbelastung danke ich **Laura Schöllhorn**! Du hast mich zudem tatkräftig durch Korrekturlesen unterstützt und mir immer ehrlich Deine Meinung gesagt.

Meine Moral und Kraft wären mit Sicherheit schon lange am Boden, wäre da nicht die Unterstützung von **Rosi** und **Hans-Dieter Schöllhorn** gewesen! Ihr habt mir Erholung verschafft, mich kulinarisch verzaubert und mir die Liebe zum Rotwein vermittelt.

Erinnere ich mich an meine Zeit als Doktorand zurück, denke ich hauptsächlich an **Dr. Martin Empting** und **Stefan Zielonka**. Ohne euch wäre ich oft verloren gewesen. Ich habe die wissenschaftliche Zusammenarbeit, aber vor allem unsere Freundschaft geschätzt. Ich danke euch beiden für so viel und werde euch sehr vermissen!

Dem **AK Kolmar** möchte ich für die gemeinsame Zeit an und abseits der *bench* danken, welche die langen und intensiven Zeiten im Labor sehr viel erträglicher machten. **Andreas Christmann** danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Sequencer-Daten. Mein spezieller Dank gilt **Karina Winterling**, **Franziska Maaß** und (erneut) **Stefan Zielonka** für die angenehme und spannende Betreuung ihrer Abschlussarbeiten. **Barbara Diestelmann** (alias Frl. Diestel) gilt mein Dank für die stetige Unterstützung, das immer offene Ohr und unsere Freundschaft.

Für die Hilfe bei der Beschaffung und Entnahme der Lama-Blutproben möchte mich bei den Mitarbeitern der zoologischen Abteilung der Universität Göttingen und des Versuchsguts Rellehausen bedanken. Ebenfalls danke ich den 12 tapferen und geduldigen Blutspendern des Versuchsguts Rellehausen.

Für die Möglichkeit, meine Probenaufbereitung in ihrem Labor durchführen zu können, möchte ich **Dr. Ursula Dietrich** danken. Mein ganz besonderer Dank geht dabei an **Dr. Maria Hertje**, ohne die eine Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen wäre.

Die Zusammenarbeit im Hai-Projekt habe ich immer sehr geschätzt. Mein Dank geht an **Prof. Dr. Michael Lierz** und **Dr. Nilz** für den wissenschaftlichen Austausch und natürlich an die gesamte **Familie Landvogt** für die herzliche Aufnahme und die professionelle Hälterung der Haie. Mein besonderer Dank geht an **Dr. Pia Ockelman** für die großartige Zusammenarbeit und ihre veterinäre Unterstützung. Auch an dieser Stelle geht mein Dank an **Dr. Martin Empting**, der für dieses Projekt unverzichtbar war, und vor allem den Initiator und Projektleiter **Stefan Zielonka**, der mich zu einem Teil seines großartigen Projekts machte.

Nicht zuletzt danke ich meinen neuen Kollegen **Astrid Meyer** und **Dr. Julian Ali Glück** für die großartige und unerwartete Hilfe bei der Bearbeitung von wissenschaftlichen Problemstellungen und beim Korrekturlesen der Dissertation.

## Inhaltsverzeichnis

Publikationen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit veröffentlicht wurden.....	I
Tagungsbeiträge.....	I
Zusammenfassung.....	III
Danksagung .....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Immunsystem .....	2
1.2 Humane Antikörper-Isotypen .....	3
1.2.1 Immunglobulin G (IgG) und davon abgeleitete Bindedomänen .....	4
1.3 Schwerkettenantikörper (HCAb) .....	6
1.3.1 VNAR – variable Domäne des <i>new antigen receptor</i> .....	8
1.4 VHH-Antikörper (variable domain of the heavy-chain of a heavy-chain antibody) ..	10
1.5 VHH-Antikörper als Biopharmazeutika.....	14
1.6 Durchmusterung von Varianten-Bibliotheken im Hochdurchsatz .....	17
1.6.1 Phagen-Oberflächenpräsentation ( <i>phage display</i> ) .....	18
1.6.2 Hefe-Oberflächenpräsentation ( <i>yeast display</i> ) .....	19
1.7 Verwendete Antigene.....	21
1.8 Zielsetzung .....	22
2 Materialien .....	25
2.1 Bakterien- und Hefestämme.....	25
2.2 Neuweltkamelide .....	26
2.3 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker .....	26
2.3.1 DNA-Längenstandards für die DNA-Elektrophorese .....	26
2.3.1.1 Lambda DNA/ <i>Eco47I</i> (AvaII) Marker, 13 (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Beglien) .....	26
2.3.1.2 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) .....	26
2.3.1.3 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) ....	27
2.3.1.4 O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range, ready-to-use (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Beglien).....	27
2.3.2 Molekulargewichtsmarker für die Proteinelektrophorese .....	28

2.3.2.1	Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI-Fermentas) .....	28
2.3.2.2	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI-Fermentas) .....	28
2.3.2.3	Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) .....	28
2.4	Oligodesoxyribonukleotide .....	29
2.5	Plasmide .....	32
2.5.1	pAKds200dsba-MT .....	32
2.5.2	pCT-VHH .....	33
2.5.3	pEXpelB-VHH.....	34
2.5.4	pTETpelB-VHH-AP .....	35
2.5.5	pYDapp8-VHH-huFC .....	36
2.6	Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren.....	37
2.7	Chemikalien.....	38
2.8	Sonstige Materialien und Geräte .....	41
2.9	Nährmedien.....	44
2.9.1	Zur Verwendung mit <i>Escherichia coli</i> .....	44
2.9.2	Zur Verwendung mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
2.10	Lösungen und Puffer.....	48
2.11	Kits .....	56
2.12	Software zur Datenverarbeitung .....	57
3	Methoden.....	59
3.1	Handhabung von Bakterien.....	59
3.1.1	Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	59
3.1.2	Vermehrung und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	59
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte.....	59
3.1.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation .....	59
3.1.5	Produktion von Proteinen in <i>Escherichia coli</i> .....	60
3.1.6	Periplasmapräparation von Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> .....	60
3.2	Handhabung von Hefen .....	61
3.2.1	Lagerung und Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	61
3.2.2	Induktion der Oberflächenpräsentation nach Wittrup <i>et al.</i> ....	61

3.3	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	62
3.3.1	Vorbereitung von verwendeten Geräten und Lösungen .....	62
3.3.2	Reinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion .....	62
3.3.3	Präzipitation von DNA mittels Ethanol und Ammoniumacetat .....	62
3.3.4	Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten durch Sucrosedichtegradientenzentrifugation .....	62
3.3.5	Agarosegelelektrophorese .....	63
3.3.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen mittels des <i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kits</i> (Promega) .....	63
3.3.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	64
3.3.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mit Hilfe des <i>Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System</i> (Promega) ...	64
3.3.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA in semi-präparativen Mengen (Midi- Präparation) mit Hilfe des <i>Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System</i> (Promega) .....	64
3.3.7.3	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen mittels CsCl-Gradient	64
3.3.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	65
3.3.9	Konzentrationsbestimmung von DNA in wässrigen Lösungen .....	65
3.3.10	Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung (454 Sequencing) .....	66
3.4	Enzymatische Manipulation von DNA .....	66
3.4.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	66
3.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	67
3.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	67
3.4.4	Kolonie PCR mit <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	69
3.4.5	<i>Splicing by overlap extension</i> PCR (SOE-PCR).....	70
3.5	Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	70
3.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässrigen Lösungen .....	70
3.5.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	71
3.5.2.1	Herstellung von 12,5 % (v/v) Polyacrylamidgelen .....	72
3.5.2.2	Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	73
3.5.2.3	Entwicklung eines SDS-Polyacrylamidgels .....	73
3.5.2.4	Immunochemischer Nachweis mittels <i>Western Blot</i> .....	73

3.5.3	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> .....	74
3.5.3.1	Zellaufschluss mittels <i>French Pressure Cell Press</i> .....	74
3.5.3.2	Zellaufschluss mittels <i>Cell Disruptor</i> .....	74
3.5.4	<i>Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography</i> (IMAC) .....	75
3.5.5	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> - FPLC.....	75
3.5.6	Dialyse von Proteinen .....	76
3.5.7	Biotinylierung von Proteinen.....	76
3.5.8	Immunchemische Analysen unter Verwendung des TECAN GENios™ ELISA readers.....	77
3.5.9	<i>Bio-Layer Interferometry</i> (fortéBIO®) .....	77
3.6	Methoden zur Gewinnung und Manipulation von RNA aus dem Vollblut von <i>Lama glama</i> .....	79
3.6.1	Immunisierungsstrategie für <i>Lama glama</i> .....	79
3.6.2	Blutentnahme bei <i>Lama glama</i> .....	79
3.6.3	Isolierung von Lymphozyten mittels Ficoll-Gradienten-Zentrifugation .....	80
3.6.4	Zellzahlbestimmung mit einem CASY®-Analysegerät.....	81
3.6.5	RNA-Extraktion aus dem Vollblut von <i>Lama glama</i> .....	81
3.6.6	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription.....	82
3.7	Methoden zur Generierung von VHH-Bibliotheken.....	83
3.7.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> ER2738 zur Generierung von <i>phagemid</i> Bibliotheken.....	83
3.7.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels Elektroporation.....	83
3.8	Durchflusszytometrische Arbeitsmethoden.....	85
3.8.1	Immunfluoreszenz-Markierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (EBY100) .....	85
3.8.2	Durchflusszytometrie mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> unter Verwendung eines MoFlo-Sortiergerätes.....	85
3.8.3	Durchflusszytometrie mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> unter Verwendung eines INFLUX Sortiergerätes.....	86
3.8.4	Analytische Durchflusszytometrie mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> am Accuri® C6 Flow Cytometer.....	86
3.8.5	Magnetische Sortierung (MACS) zur Abreicherung von unerwünschten Zellpopulationen.....	86

4	Ergebnisse und Diskussion.....	89
4.1	Erstellung und Durchmusterung einer naiven VHH-Bibliothek aus <i>Lama glama</i> .....	89
4.1.1	Konzept zur Gewinnung des naiven VHH-Repertoires .....	89
4.1.2	Probenentnahme und Generierung der cDNA.....	90
4.1.3	Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek im Phagen-Format .....	94
4.1.3.1	Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.....	95
4.1.3.2	Vorbereitung von VHH-DNA und Vektor sowie anschließende Klonierung .	96
4.1.3.3	Generierung der VHH-Bibliothek durch Transformation von <i>Escherichia coli</i> ER2738 .....	97
4.1.4	Validierung der VHH-Bibliothek im Phagen-Format.....	97
4.1.5	Diskussion.....	99
4.1.6	Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek im Hefe-Format .....	101
4.1.6.1	Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA sowie des Vektors pCT ....	103
4.1.6.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 zur Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek durch homologe Rekombination .....	104
4.1.7	Validierung der naiven Hefe-Bibliothek.....	105
4.1.7.1	Validierung durch Einzelklon-Sequenzierung .....	105
4.1.7.2	Validierung mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung .....	106
4.1.7.3	Mikroskopische und Durchflusszytometrische Analyse .....	108
4.1.8	Diskussion.....	110
4.1.9	FACS gestützte Durchmusterung der Hefe-Bibliothek.....	111
4.1.9.1	Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Bindern gegen humanes C4b Protein .....	112
4.1.9.2	Durchflusszytometrische Analyse von Einzelklonen der Durchmusterung gegen hC4bp .....	114
4.1.9.3	Diskussion .....	116
4.1.9.4	Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Bindern gegen Saglin aus <i>Anopheles spec.</i> ....	117
4.1.9.5	Vertiefung der Analyse der Saglin-Einzelklone 3 und 5.....	122
4.1.9.6	Titration auf Hefezellen zur Bestimmung der Bindeeigenschaften des Saglin-Einzelklons 3.....	124

4.1.9.7	Diskussion.....	125
4.1.9.8	Durchmusterung der naiven VHH-Bibliothek nach Bindern gegen humanes P-Cadherin .....	127
4.1.9.9	Vertiefung der Analyse von Einzelklon 2 und 4.....	132
4.1.9.10	Diskussion der Ergebnisse.....	139
4.1.10	Zusammenfassung.....	140
4.2	Erstellung und Durchmusterung einer durch Immunisierung affinitätsgereiften VHH-Bibliothek aus <i>Lama glama</i> .....	142
4.2.1	Erstellung einer affinitätsgereiften VHH-Antikörper-Bibliothek in Hefen.....	142
4.2.1.1	Immunchemische Analyse des Prä- und Postserums.....	143
4.2.1.2	Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA sowie des Vektors pCT ....	145
4.2.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 durch homologe Rekombination zur Erstellung einer durch Immunisierung affinitätsgereiften VHH-Bibliothek.....	147
4.2.3	Validierung der affinitätsgereiften VHH-Hefebibliothek.....	148
4.2.4	Diskussion.....	150
4.2.5	Durchmusterung der affinitätsgereiften VHH-Hefe-Bibliothek mittels FACS.....	151
4.2.5.1	Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen huEGFR .....	152
4.2.5.2	Analyse der huEGFR bindenden Einzelklone.....	154
4.2.5.3	Zusätzliche Sortierungen nach huEGFR bindenden Hefezellen .....	158
4.2.5.4	Analyse von Einzelklonen der zweiten Durchmusterung nach huEGFR bindenden Hefezellen.....	161
4.2.5.5	Diskussion der Ergebnisse.....	163
4.2.5.6	Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen EphA2.....	164
4.2.5.7	Diskussion der Ergebnisse.....	167
4.2.5.8	Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen mEGFR .....	168
4.2.5.9	Diskussion der Ergebnisse.....	170
4.2.6	Zusammenfassung der löslichen Expression von VHH-Antikörpern in <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	171
4.2.6.1	Verwendung des Vektorkonstrukts pEX in <i>Escherichia coli</i> .....	172
4.2.6.2	Verwendung der Vektorkonstrukte pMX und pTET in <i>Escherichia coli</i> .....	173
4.2.6.3	Verwendung des Vektorkonstrukts pYD in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	174



4.2.6.4	Diskussion der Ergebnisse.....	176
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	179
6	Literaturverzeichnis.....	181
	Lebenslauf.....	XXI



## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Aga1p	<i>a-Agglutinin Untereinheit 1 / a-agglutinin anchoring subunit 1</i>
Aga2p	<i>a-Agglutinin Untereinheit 2 / a-agglutinin anchoring subunit 2</i>
BCR	<i>B-Zell-Rezeptor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CH	<i>constant heavy</i>
CL	<i>constant light</i>
cm	<i>Zentimeter</i>
D	<i>Dextrose</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor /</i> <i>Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
EphA2	<i>Ephrinrezeptor A2</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystalizing</i>
FDA	<i>U.S. food and drug administration</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
Fr	<i>framework</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
Gal	<i>Galaktose</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HA	<i>Hämagglutinin</i>
HV	<i>hyper-variable loop</i>
HCAb	<i>heavy-chain antibody /</i> <i>Schwerkettenantikörper</i>
i. d. R.	<i>in der Regel</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IgG	<i>Immunglobulin G (gamma)</i>
IgNAR	<i>immunoglobulin new antigen receptor</i>
k <sub>a</sub>	<i>Assoziationsrate</i>

Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
$k_d$	Dissoziationsrate
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationsrate oder Affinitätskonstante
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LiAc	Lithiumacetat
M	Mol
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
n.b.	nicht beschrieben
nm	Nanometer
mM	Millimol
$\mu$ M	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Di-Natriumhydrogenphosphat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
nM	Nanomol
NME	<i>new molecular entity</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rel.	relativ
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAPE	Streptavidin, R-Phycoerythrin
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
sek	Sekunde
Std	Stunde

---

TCR	T-Zell-Rezeptor
TRP	Tryptophan
TU	Technische Universität
TUD	Technische Universität Darmstadt
U	<i>Unit</i> (Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
VDJ	<i>variable; diversifying; joining</i>
VDJ-Rekombination	auch: somatische Rekombination
VH	<i>variable heavy</i>
VHH	<i>variable chain of the heavy-chain of a heavy-chain antibody</i>
VL	<i>variable light</i>
VNAR	<i>variable fragment of the new antigen receptor</i>
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel



---

## 1 Einleitung

---

Mit der Entdeckung der Hybridomatechnologie durch Georges Köhler und César Milstein im Jahre 1975 wurde der Zugang zu monoklonalen Antikörpern geöffnet<sup>[26]</sup>. Die hohe Spezifität und Affinität gegenüber den Antigenen machten diese Moleküle zu einem begehrten Instrument für den Einsatz in zahlreichen Gebieten der Diagnostik, medizinischen Therapie und Analytik<sup>[27]</sup>. Pharmaunternehmen suchen nun seit über 60 Jahren nach geeigneten therapeutischen Wirkstoffkandidaten. Zwischen 1950 und 2008 vergab die FDA (US *food and drug administration*) 1.220 Zulassungen für neue Therapeutika, sogenannte NMEs (*new molecular entities*)<sup>[28]</sup>. Davon waren 1.103 sogenannte *small molecules*. Mit der Zulassung für Muromab-CD3 im Jahre 1986, wurden therapeutische Antikörper vollständig etabliert<sup>[29]</sup>. Bis 2008 wurden 119 Biologika von der FDA zugelassen und therapeutische Antikörper stellen heute den am schnellsten wachsenden Sektor der Pharmazeutika dar<sup>[29]</sup>. Fast alle Antikörper-Präparate bestehen aus IgGs (Immunglobulin G) bzw. aus abgeleiteten Fragmenten, wie scFv oder Fab (Abbildung 1). Ihre Vielseitigkeit bezüglich der hochaffinen Bindung von Zielproteinen sowie dadurch vermittelte Modifikationen der biologischen Aktivität der Antigene und die Fähigkeit, endogene Effektoren zu rekrutieren oder Toxophore spezifisch zu adressieren, sind der Grund ihres kommerziellen Erfolgs<sup>[7], [29]</sup>.

Dennoch ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern bisweilen limitiert<sup>[7]</sup>. Ihre komplexe Architektur und hohe molekulare Masse (150 kDa) sind für einige Anwendungen von großem Nachteil. Sie sind außerdem potentiell immunogen, nicht oral applizierbar und nur begrenzt für intrazelluläre Antigene sowie Antigene des Nervensystems einsetzbar<sup>[29]</sup>. Des Weiteren verursacht ihre Größe Nachteile beim Einsatz im Bereich der Tumordiagnostik. Über 85 % der Krebsformen bei Menschen liegen als solide Tumore vor<sup>[30]</sup>. Jedoch benötigt man in der Tumorthherapie i. d. R. ein hohes Maß der Antikörper-Akkumulierung im gesamten Bereich des soliden Tumors<sup>[31]</sup>. Der hauptsächlich durch Diffusion getriebene Transport von Makromolekülen innerhalb von Tumoren ist umgekehrt proportional zu deren Molekülgröße und deshalb bei IgGs deutlich eingeschränkt<sup>[32]–[34]</sup>.

Ein Ansatz, diese Nachteile zu umgehen, ist die Reduzierung der Molekülgröße der Antikörper. Die dabei kleinste, direkt abgeleitete Bindeeinheit eines Antikörpers, sind seine variablen Bindedomänen VL (*variable light*) und VH (*variable heavy*)<sup>[35]</sup>. Erste Ansätze für den Einsatz dieser Domänen, sowohl als singuläre Fragmente (VL oder VH), als auch als Herterodimere (Fv) schlugen aufgrund von zu geringen Produktionsausbeuten, niedriger Stabilität und hoher Aggregatbildung fehl<sup>[36]</sup>. Es sind bislang nur Ausnahmen von VH-Domänen mit ausreichender Stabilität und Löslichkeit bekannt<sup>[37]</sup>. Erst der Einsatz von Disulfiden oder Polypeptidlinkern zwischen den beiden Bindedomänen VL und VH im Jahr 1989 führte zu stabilen Antikörperfragmenten, den sogenannten Fab- (*fragment antigen binding*)<sup>[38]</sup> bzw. scFv-Fragmenten (*single chain variable fragment*; Abbildung 1)<sup>[39]</sup>. Mit einer molekularen Masse von etwa 50 kDa (Fab) bzw. 27 kDa (scFv) gegenüber 150 kDa (IgG) wurde diese also bereits stark reduziert. Mit der ein Jahr später entwickelten Technologie des *phage displays*<sup>[40]</sup> gelang die

schnelle und effektive Isolierung von murinen und humanen Antikörperfragmenten <sup>[41]–[43]</sup>. Diese Antikörperfragmente bestehen jedoch immer noch aus mindestens zwei über hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbundene Domänen und sind aufgrund dessen oft in ihrer Stabilität begrenzt. Des Weiteren bildet der Zusammenschluss aus VL und VH ein ebenso großes Paratop wie das von IgGs und ist vornehmlich für die Bindung von Epitopen an Oberflächen geeignet <sup>[7]</sup>.

Wo bislang der molekularbiologische Versuch scheiterte, Einzeldomänen-Antikörper wie VH-Domänen zu erzeugen, bietet die Natur bereits zwei solcher Fragmente in der Familie der Kameliden sowie der Knorpelfische an <sup>[10], [44]–[46]</sup>. Die Schwerekettenantikörper (HCAbs) der Kameliden sowie der Knorpelfische sind Homodimere, deren Antigenbindestelle nur aus einer Domäne besteht (Abbildung 3 und Abbildung 5) <sup>[45]</sup>. Die variable Domäne der IgNARs (*immunoglobulin new antigen receptors*) aus der Familie der Knorpelfische, die als VNAR (*variable domain of the new antigen receptor*) bezeichnet werden, sind die zurzeit kleinsten bekannten Antikörperfragmente (12 kDa) und haben hohe Sequenzhomologien mit der variablen Domäne der  $\kappa$ -Kette von IgGs und T-Zellrezeptoren <sup>[47], [48]</sup>. Die variable Domäne der Schwerekettenantikörper von kameliden, welche als VHH (*variable chain of heavy-chain of a heavy-chain antibody*) bezeichnet wird, hat eine 80 % Sequenzhomologie mit der humanen VH-Domäne aus der Familie III und besitzt eine ähnlich geringe molekulare Masse (15 kDa) wie VNARs <sup>[44]</sup>. VHH-Antikörperdomänen sind äußerst stabil <sup>[49]</sup> und vergleichsweise gut wasserlöslich <sup>[44]</sup>. Sie bestehen nur aus einem Exon und sind daher sehr gut für genetische Manipulationen (simple Amplifikation, genetische Fusion mit Epitop-Tags, *in vitro* Optimierung, etc.) geeignet. Aufgrund ihrer hohen Homologie mit VH-Domänen der humanen Familie III sind Humanisierungen mit nur geringem Aufwand verbunden <sup>[7]</sup>. Trotz ihrer kleineren Bindeoberfläche sind VHHs in der Lage, Antigene mit nanomolaren Affinitäten zu binden, was auf die Vergrößerung des Paratops, bedingt durch eine verlängerte CDR3, zurückgeführt werden kann <sup>[7], [50]</sup>. Diese und viele weitere Eigenschaften verleihen VHH-Antikörpern ein großes Potential in den Bereichen der Therapeutik, der Diagnostik sowie der Biotechnologie <sup>[51]–[53]</sup>.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Integrierung von VHH-Bibliotheken in geeignete Oberflächenpräsentations-Plattformen zur Nutzung für die Durchmusterung nach neuen Bindemolekülen im Hochdurchsatzverfahren.

---

## 1.1 Immunsystem

---

Der Stamm der Vertebraten verfügt über eine Reihe von Effektorzellen und Moleküle, die das Immunsystem bilden. Das Immunsystem schützt den Organismus vor Krankheitserregern und die durch sie verursachten Schäden sowie vor toxischen Substanzen anderer Organismen <sup>[54]</sup>. Das Immunsystem lässt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen. Die erste Instanz wird vom angeborenen Immunsystem gebildet, welches immer zur Verfügung steht und unspezifisch ein breites Spektrum an Krankheitserregern bekämpfen kann. Ein Beispiel hierfür sind Makrophagen, die fremde Mikroorganismen phagozytieren und so elimi-



nieren können <sup>[54]</sup>. Dagegen wirkt das adaptive Immunsystem hochspezifisch. Eindringende Pathogene können durch unreife dendritische Zellen aufgenommen werden. Diese Zellen tragen ebenso wie Makrophagen oder neutrophile Zellen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die sie dazu befähigen, allgemeine Merkmale von Pathogenen, wie bakterielle Lipopolysaccharide, zu erkennen <sup>[54]</sup>. Durch die Bindung der Fremdmoleküle an diese Rezeptoren, werden die Phagozytose und der intrazelluläre Abbau des Pathogens eingeleitet. Die dendritischen Zellen migrieren nach Aufnahme des Pathogens unter Heranreifung in peripheres lymphatisches Gewebe, wo sie Fragmente des aufgenommenen Pathogens auf ihrer Oberfläche präsentieren und gleichzeitig Zelloberflächenproteine produzieren. Diese als kostimulierende Moleküle bezeichneten Signalmoleküle bewirken zusammen mit dem präsentierten Antigen die Stimulierung von T-Lymphozyten, die daraufhin beginnen, sich zu teilen und zu T-Effektorlymphozyten zu differenzieren <sup>[54]</sup>. Eine Aufgabe dieser T-Effektorlymphozyten ist es, einer weiteren Gruppe von Lymphozyten, den B-Lymphozyten, zusätzliche Signale zu liefern und diese zu stimulieren. B-Zellen können ebenfalls Antigene mit den auf ihrer Oberfläche sitzenden B-Zellrezeptoren (BCR) binden und erkennen. Durch die Antigenbindung und die T-Zell-Stimulation beginnt die B-Zelle zu proliferieren und sich zur Plasmazelle zu differenzieren. Die Plasmazelle ist die Effektorform der B-Zelle und sezerniert Antikörper, welche die gleiche Antigenspezifität besitzen wie die B-Zell-Rezeptoren der vorangegangenen B-Zelle <sup>[54]</sup>.

---

## 1.2 Humane Antikörper-Isotypen

---

Das adaptive Immunsystem der Vertebraten wirkt in erster Linie durch den Einsatz von Antigen-spezifischen Antikörpern, die zur Klasse der Immunglobuline (Ig) gehören. Sie liegen membranständig als B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten vor und werden in löslicher Form von differenzierten Plasmazellen sezerniert <sup>[54]</sup>. Die Antikörper binden dabei Epitope von in den Organismus eingedrungenen Fremdorganismen und aktivieren dadurch Abwehrprozesse, welche zur Eliminierung dieser Fremdorganismen führen. Das Antikörperrepertoire der *Mammalia* beinhaltet verschiedene Isotypen, die sich anhand ihrer schweren Kette und der damit verbundenen Effektor-Funktion differenzieren. Man unterscheidet die Isotypen IgM, IgA, IgD, IgE und IgG. Die unterschiedlichen schweren Ketten werden durch verschieden Keimbahngene codiert (IgM=C $\mu$ ; IgA=C $\alpha$ ; IgD=C $\delta$ ; IgE=C $\epsilon$ ; IgG=C $\gamma$ ) <sup>[54]</sup>.

Der Antikörper-Isotyp IgM bildet die erste Instanz bei der humoralen Immunantwort und wird zuerst sezerniert. Die Affinität der IgM gegenüber den Antigenen ist hierbei noch gering. IgM liegt meist als Pentamer vor und besitzt (wie der Isotyp IgE) vier konstante Domänen. Damit kommt ein IgM-Pentamer auf ein Molekulargewicht von 970 kDa. Durch die Anordnung als Pentamer können mehrere Antigene zu einer Stapelform gepackt werden, welche die Bindung des Proteins Clq begünstigt, das wiederum das Komplementsystem aktiviert <sup>[55]</sup>. IgMs werden außerdem auf der Oberfläche von naiven B-Zellen präsentiert <sup>[54]</sup>. Der Isotyp IgA wird in zwei

Unterklassen unterteilt. Er liegt als Monomer, Dimer sowie Trimer vor, wobei das Monomer ein Molekulargewicht von 160 kDa besitzt. Die schwere Kette ist aus drei konstanten Domänen aufgebaut. IgA ist hauptsächlich auf mukosem Gewebe (Schleimhäuten) lokalisiert und dort für die humorale Immunantwort verantwortlich <sup>[54]</sup>.

IgD besitzt ein Molekulargewicht von etwa 180 kDa. Dieser Isotyp ist auf der Zelloberfläche von naiven B-Lymphozyten zu finden und kommt im Serum nur in sehr geringen Konzentrationen vor <sup>[54]</sup>.

Der Isotyp IgE besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa, bedingt durch seine vierte konstante Domäne der schweren Kette. Er liegt als Monomer vor und ist maßgeblich bei der Immunabwehr gegen Parasiten und Würmer beteiligt. Darüber hinaus ist er verantwortlich für allergische Immunreaktionen des Soforttyps <sup>[54]</sup>.

Nach der primären Immunantwort durch den Subtyp IgM wird nach kurzer Zeit vermehrt der Isotyp IgG sezerniert, der durch die somatische Hypermutation bereits eine höhere Affinität gegenüber den Antigenen aufweist. Dieser Isotyp-Wechsel wird als *isotype switching* bezeichnet. Der Isotyp IgG wird im menschlichen Organismus aufgrund der Keimbahngene C $\gamma$ 1-4 in vier Unterklassen aufgeteilt (IgG 1-4). Alle IgGs haben ein Molekulargewicht von 150 kDa, sowie eine Serumkonzentration von etwa 0,5-9 mg/ml. Sie sind für die Makrophagen- und Komplementaktivierung verantwortlich sowie für die Aktivierung der Sekundärantwort. An Antigene gebunden, vermitteln IgGs über natürliche Killerzellen die ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) <sup>[54], [56]</sup>.

---

### 1.2.1 Immunglobulin G (IgG) und davon abgeleitete Bindedomänen

---

Immunglobuline des Typs G (IgG) sind aus drei Fragmenten aufgebaut. Den beiden für die Antigen-Bindung verantwortlichen und identischen Fabs (ab = *antigen-binding*) sowie dem C-terminalen konstanten Teil Fc (c = *crystalizing*). Die Fab-Fragmente und der Fc-Teil sind durch eine Gelenkregion (*hinge*) miteinander verbunden, die in ihrer Länge und Flexibilität variiert (Abbildung 1). Jedes Fab-Fragment ist wiederum aus je einer leichten Kette, bestehend aus einer konstanten CL-Domäne (*constant light*) sowie einer variablen VL-Domäne (*variable light*) und dem N-terminalen Teil der schweren Kette, ebenfalls bestehend aus einer konstanten CH1-Domäne (*constant heavy 1*) sowie einer variablen Domäne VH (*variable heavy*), aufgebaut (Abbildung 1). Die leichte Kette (VL-CL) existiert in einer  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Variante, die sich jedoch funktionell nicht unterscheiden lassen <sup>[54], [56]</sup>. Fab-Fragmente lassen sich außerdem in die das Paratop bildende Binde-Domäne (VL-VH) sowie den konstanten Teil (CL-CH1) trennen. Beide Teile bilden jeweils ein kompaktes Modul und sind zwischen den variablen und konstanten Domänen über einen kurzen Linker verbunden (*switch*). Die beiden konstanten Bereiche (CL und CH1) sind durch eine Disulfidbrücke miteinander kovalent verknüpft. Die beiden schweren Ketten sind jeweils durch zwei Disulfidbrücken in der *hinge* Region miteinander verbunden <sup>[54], [56]</sup>.

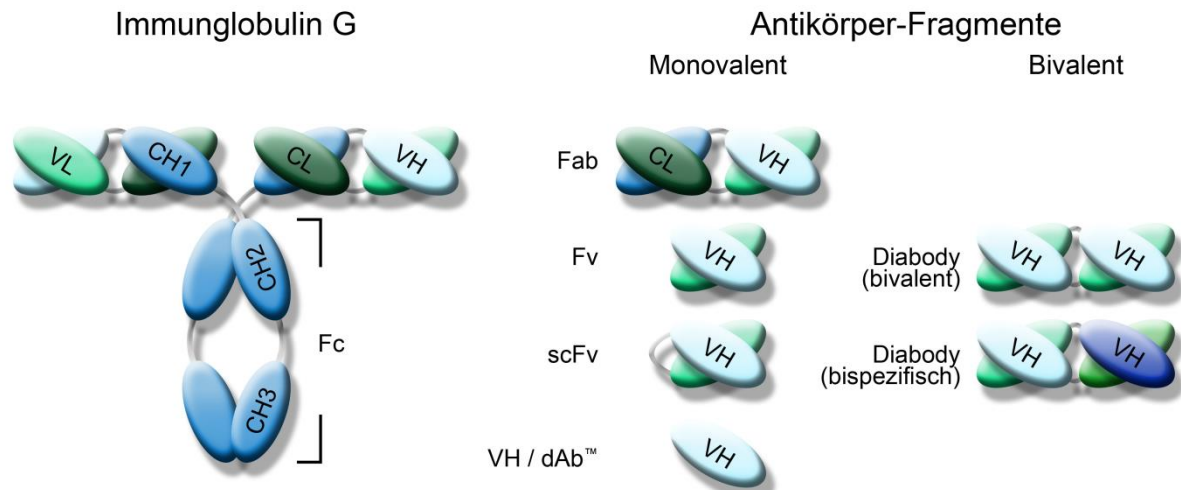


Abbildung 1: Aufbau eines IgG (Immunglobulin G) sowie verschiedener daraus abgeleiteter Antikörper-Fragmente. Monovalente Antikörper-Fragmente **Fab**, **Fv** und **VH (dAb™)** sowie das rekombinante **scFv**. Bivalente scFv-Dimere, sogenannte **Diabodies**, gegen identische Epitope (**Diabody bivalent**) oder unterschiedliche Epitope (**Diabody bispezifisch** bzw. **biparatopisch**).

Eine Funktion des Fc-Teils ist die Bindung durch Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immuneffektorzellen, wie beispielsweise der Fc $\gamma$ -Rezeptor auf Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten). Durch die Bindung eines Antigen-Antikörper-Komplexes wird die Phagozytose von Pathogenen erleichtert. Des Weiteren bindet der Fc-Teil an Komplementproteine und löst so die Komplementkaskade aus, was wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von Phagozyten und einer direkten Zytolyse von pathogenen Organismen führt<sup>[54]</sup>. Außerdem dient der Fc-Teil für Rezeptor-abhängige aktive Transporte über Zellen in andere Bereiche des Organismus.

Die Grundstruktur der einzelnen Domänen innerhalb eines Antikörper-Moleküls ist sehr ähnlich. In jeder Domäne sind mehrere  $\beta$ -Stränge antiparallel zu zwei  $\beta$ -Faltblättern gepackt, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und stabilisiert werden<sup>[54]</sup>. Die dadurch entstehende Form der Domänen wird als  $\beta$ -Zylinder bezeichnet. Die Anordnung der  $\beta$ -Stränge in einem  $\beta$ -Faltblatt besitzt dabei einen charakteristischen Aufbau. In konstanten Domänen eine vier-plus-drei, in variablen Domänen eine vier-plus-fünf  $\beta$ -Strang Anordnung<sup>[54]</sup>. Die richtungsändernden Schleifen zwischen den einzelnen  $\beta$ -Strängen weisen ebenfalls eine hohe Identität auf. Der wesentliche Unterschied zwischen den konstanten und variablen Domänen ist eine zusätzliche Schleife in den variablen Domänen<sup>[54]</sup>.

Die Besonderheit der variablen Domänen sind drei hypervariable Schleifen (CDR1-3 = *complementarity determining regions*), welche die Antigen-Bindung vermitteln. Dabei bilden jeweils die CDR1-3 aus VH und VL ein gemeinsames Paratop. Durch die dimere Struktur der Antikörper mit zwei gleichen Fab-Fragmenten sind diese bivalent und können zwei identische Antigene zur gleichen Zeit binden<sup>[54]</sup>.

Wie bereits unter Abschnitt 1 beschrieben, wurden aus Gründen der teilweise eingeschränkten Einsetzbarkeit von IgGs davon abgeleitete Antikörper-Fragmente entwickelt. Diese mono- (Fab, Fv, scFv, VH) oder bivalenten (*diabody*, mono- oder bispezifisch) Antikörper-Fragmente sind deutlich kleiner als Antikörper und haben dadurch verschiedene Vorteile, wie beispielsweise verbesserte Diffusions-Eigenschaften und Gewebepenetration (Abbildung 1). Jedoch besitzen diese Fragmente keine hohe Stabilität. Außerdem ist die Antigen-Bindestelle direkt abgeleitet von IgGs und bietet keinen Vorteil für die Adressierung von alternativen oder schwer erreichbaren Epitopen <sup>[7]</sup>. Ein Ansatz den Vorteil einer Größenreduktion und gleichzeitig ein stabiles Gerüst mit verkleinerter Antigen-Bindestelle zu nutzen, bietet eine spezielle Klasse von Schwerkettenantikörpern, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

### 1.3 Schwerkettenantikörper (HCAb)

Die Diversität von Antikörpern, die für die hohe Flexibilität und Spezifität bei der Bindung von theoretisch allen denkbaren Antigenen verantwortlich ist, entsteht durch die Zusammenführung verschiedener Immunglobulin-Gensegmente während der Reifung der B-Lymphozyten. Es existieren zwei unterschiedliche Typen V-Gene (*variable genes*) an zwei unterschiedlichen Loci im Genom, welche die leichte (L / *light*) bzw. schwere (H / *heavy*) Kette hervorbringen. V-Gene wurden in vielen Vertretern der Vertebraten zu unterschiedlichen Familien und Unterfamilien weiterentwickelt, wodurch eine große Vielfalt an Immunglobulinen mit heterodimeren Bindedomänen (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) hervorgebracht wurde <sup>[57], [58]</sup>. Neben diesen als konventionellen Antikörpern bezeichneten Immunglobulinen existiert jedoch noch ein weiterer Antikörper-Typus, der ausschließlich in den Familien der *Camelidae* (Kamele, Dromedare, Lamas, etc.) und *Chondrichthyes* (Haie, Rochen und Holocephali) zu finden ist und lediglich aus zwei schweren Ketten besteht (H<sub>2</sub>) <sup>[59], [60]</sup>. Die evolutive Entwicklung von HCABs (*heavy-chain-only antibodies* oder *heavy-chain antibodies*), die in keiner anderen Familie der Wirbeltiere zu finden sind und ein Beispiel evolutiver Konvergenz darstellt, wurde bereits eingehend untersucht. Ihr Ursprung wurde in der Entwicklungsgeschichte der Vertebraten kartiert. Es konnten jedoch bislang keine eindeutigen Gründe für ihre Entstehung gefunden werden <sup>[58]</sup>.

Die Entstehung von HCAb-codierenden Ig-Genen in Kameliden wurde anhand phylogenetischer Studien bestimmt und liegt etwa 25 Millionen Jahre zurück (Abbildung 2) <sup>[61], [62]</sup>. Sie ereignete sich also nach der Abspaltung der *Tylopoden* von anderen *Mammalia* (vor etwa 60-80 Millionen Jahren) und noch vor der Artbildung der einzelnen Vertreter der Kameliden (vor etwa 11 Millionen Jahren) <sup>[62]</sup>. Dies ist vor allem auf die Abstammung der HCAb-codierenden  $\gamma$ -Gene von denen der konventionellen Antikörper sowie der Abstammung der VHH-Gene von klassischen VH-Genen zurückzuführen.

Der Ursprung der HCABs der *Chondrichthyes*, die als IgNAR (*immunoglobulin new antigen receptor* oder *novel antigen receptor*) bezeichnet werden, ist bislang noch nicht genau aufgeklärt. Da man jedoch IgNARs in allen Organismen der Unterklasse der *Elasmobranchii* findet, liegt

dieser höchstwahrscheinlich mindestens 220 Millionen Jahre zurück (Abbildung 2). Des Weiteren findet man in allen lebenden Knorpelfischen die variable Einzeldomäne als T-Zellrezeptor (TCR), bezeichnet als NAR-TCR <sup>[63], [64]</sup>. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der Ursprung wahrscheinlich sogar mindestens 350 Millionen Jahre zurückliegt.

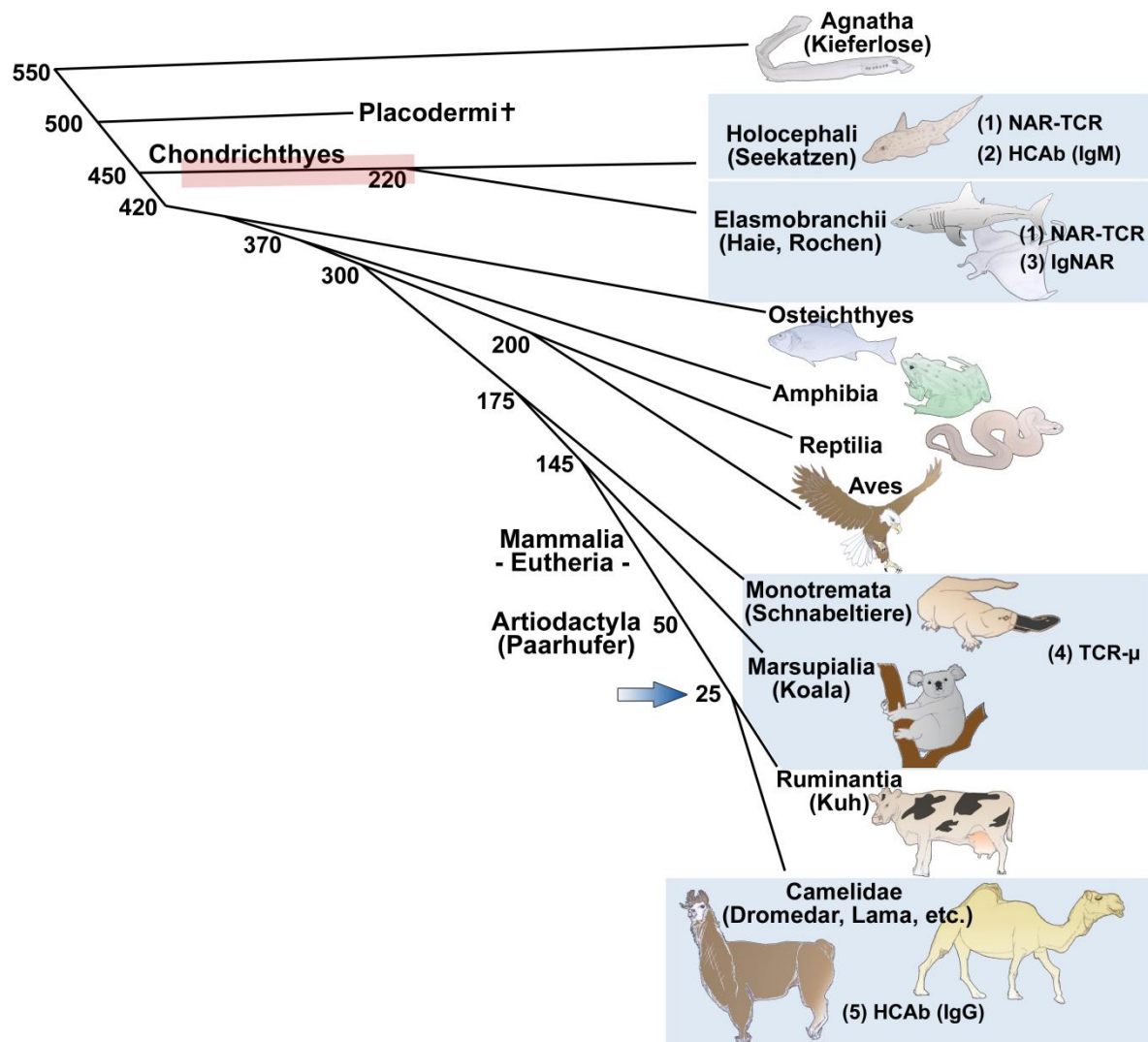


Abbildung 2: Vereinfachte phylogenetische Karte mit Darstellung solcher Gruppen (blaue Kästen), welche über variable Einzeldomänen verfügen. Die bislang bekannten Immunglobuline mit Einzeldomänen sind NAR-TCR (1), *Holocephali* HCAb (2), IgNAR (3), *Monotremata/Marsupialia* Ig $\mu$  (4) und HCAb der *Camelidae* (5). Die vermuteten Datierungen für die Entstehung von IgNARs der *Elasmobranchii* und der HCABs der *Camelidae* sind durch einen roten Kasten bzw. einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Die Zahlen (links) geben die Jahre der Divergenz (in Millionen Jahren) für die verschiedenen Vertebraten-Taxa an. Abbildung selbst erstellt nach Flajnik, Deschacht und Muyldermans (2011) <sup>[58]</sup>.

Der Grund für die Entstehung dieser Schwerekettenantikörper ist bislang ungeklärt. Da diese Konvergenz jedoch in Spezies mit einem solch fernen Verwandtschaftsgrad auftrat, müssen beide Gruppierungen einem ähnlich starken evolutionären Druck ausgesetzt gewesen sein. Außerdem müssen die Vorteile der entstandenen neuen Schwerekettenantikörper so gravie-

rend gewesen sein, dass es zur dauerhaften Etablierung dieser Antikörper im Immunsystem kam <sup>[58]</sup>. Es wurden einige mögliche Hypothesen aufgestellt, die beispielsweise eine fehlerhafte leichte Kette (wie etwa bei Amyloidose <sup>[65]</sup>) oder einen Virus, das die leichte Kette als Korezeptor nutzte, nennen <sup>[58]</sup>. Ein allgemeinerer Lösungsansatz ist die Vermutung, dass durch die Verkleinerung der Antigenbindestelle, bedingt durch die Eliminierung der leichten Kette, die Bindung von schwer adressierbaren Epitopen, wie aktiven Zentren von Enzymen oder Rezeptorbindestellen <sup>[50], [66]–[68]</sup>, ermöglicht wurde und sich dieser deutliche Vorteil dauerhaft manifestierte <sup>[58]</sup>.

Diese und weitere interessante Eigenschaften der Schwerkettenantikörper, die auf ihren speziellen Aufbau zurückzuführen sind, machen sie gegenüber konventionellen Antikörpern wie IgGs zu einer exzellenten Alternative in verschiedenen Anwendungsbereichen. Das Interesse liegt hierbei vor allem auf den Bindedomänen der HCAs, die aufgrund der fehlenden leichten Kette (VL) als Einzeldomänen vorliegen. Dieser Umstand und die dabei einhergegangene evolutive Entwicklung der beiden Bindedomänen, VNAR (*variable domain of the new antigen receptor*) und VHH (*variable domain of the eavy-chain of a eavy-chain antibody*), rückte sie in den vergangenen Jahren in den wissenschaftlichen Fokus <sup>[7], [19], [45], [69]–[71]</sup>. In den nachfolgenden beiden Abschnitten werden diese Antikörper-Fragmente näher beschrieben.

---

### 1.3.1 VNAR – variable Domäne des *new antigen receptor*

---

Die Vertreter der Klasse der *Chondrichthyes* (Knorpelfische), zu denen Haie und Rochen gehören, sind die phylogenetisch ältesten, noch lebenden Organismen, die über ein für Vertebraten typisches adaptives Immunsystem und den damit auftretenden Antikörpern verfügen <sup>[64], [72], [73]</sup>. Der evolutive Weg der Antikörper von Haien war demnach besonders lang und erfolgte außerdem unter extremen Bedingungen. Das Blut von Haien enthält beispielsweise aus Gründen der Osmoregulation einen hohen Anteil an Harnstoff (350 mM), welcher jedoch stark denaturierende Eigenschaften besitzt <sup>[10], [74]</sup>. Das Antikörper-Repertoire von Haien umfasst nach heutigem Wissensstand drei Isotypen an Antikörpern, darunter die beiden konventionellen IgM und IgW sowie die sogenannten IgNAR (*immunoglobulin new antigen receptor*). Die IgNAR zählen wie die HCAs der Kameliden zu den Schwerkettenantikörpern. Sie bestehen aus nur zwei schweren Ketten, aufgebaut aus jeweils fünf konstanten Domänen (C1-C5), und besitzen keine leichte Kette (Abbildung 3) <sup>[47], [75]</sup>. Ihre Antigenbindestelle besteht somit ebenfalls lediglich aus einer einzelnen Domäne, genannt VNAR (*variable domain of the new antigen receptor*) <sup>[10], [60]</sup>, und ist mit etwa 12 kDa die zurzeit kleinste bekannte Antikörper-Bindedomäne (Abbildung 3) <sup>[9], [10]</sup>. VNAR-Domänen besitzen eine nur geringe Homologie mit VH-Domänen der IgM oder IgW, dagegen eine hohe mit V-Domänen der TCR oder IgL <sup>[75]</sup>.



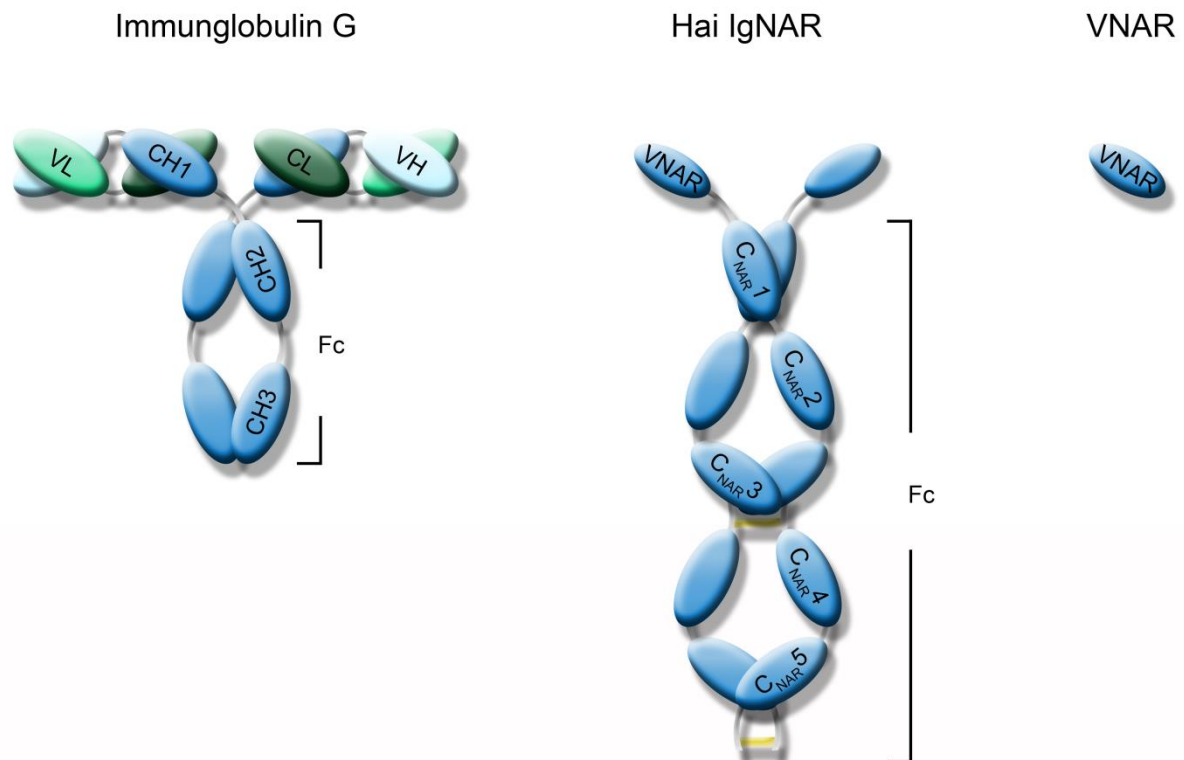


Abbildung 3: Aufbau und Vergleich eines IgG und eines Hai-IgNAR sowie einer daraus abgeleiteten VNAR-Bindedomäne. Die beiden zusätzlichen Disulfidbrücken zwischen konstanten C<sub>NAR</sub>-Domänen sind mit einem gelben Balken gekennzeichnet.

Zusätzlich zu den zwei kanonischen Cysteinen besitzen VNARs weitere Cysteine, deren Anzahl und Position eine Einteilung der IgNAR in zwei Subtypen erlaubt. Typ I IgNAR besitzen zwei nicht kanonische Cysteine in FR2 und FR4 sowie zwei bis vier weitere in der CDR3. Die zusätzlichen Cysteine der Typ II IgNAR befinden sich in der CDR1 sowie CDR3 und bilden eine inter-CDR-Cysteinbrücke ähnlich der in VHHs (vergleiche Abbildung 4 und Abbildung 6) <sup>[75]</sup>. Zusätzlich wurde ein dritter IgNAR Typ (Typ III) in Neugeborenen identifiziert, der jedoch keine Diversität in der CDR3 aufweist. Dieser IgNAR-Typ ist in den ersten vier Monaten in großen Mengen in der Milz der Jungtiere zu finden. Es wird vermutet, dass der IgNAR Typ III die Jungtiere vor einem bestimmten Pathogen schützt oder in der frühen Regulation des Immunsystems involviert ist <sup>[12]</sup>.

Die geringe molekulare Masse verdanken VNAR einer Deletion in der FR2-CDR2-Region (Abbildung 4). Dadurch wurde die FR2 verkürzt und die ursprüngliche CDR2 deletiert sowie durch eine deutlich kürzere hypervariable Schleife (*hypervariable loop*; HV2) ersetzt <sup>[75]</sup>. Diese kurze  $\beta$ -Schleife ist an der Paratop-abgewandten Seite der VNAR-Domäne lokalisiert und besitzt eine nur geringe Variabilität, was darauf schließen lässt, dass sie nur einen geringen Beitrag zur Antigen-Bindung leistet <sup>[47]</sup>. Die geringe Größe der HV2 und die durch die Deletion der CDR2 erzeugte konkave Tasche ermöglicht jedoch ein alternatives Modell der Antigenbindung <sup>[47]</sup>. Zusätzlich zur HV2 besitzen VNAR eine weitere kurze hypervariable Schleife im FR3, die als HV4 bezeichnet wird. Diese Schleife ist noch erheblich kürzer als HV2 <sup>[75]</sup>.

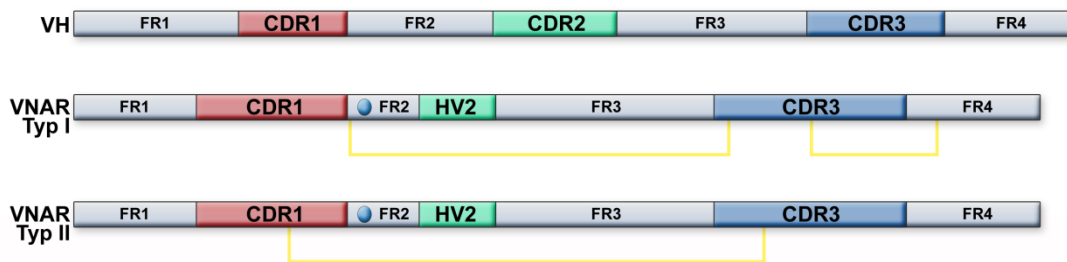


Abbildung 4: Schematischer Vergleich des Aufbaus von VH- und VNAR (I und II)-Domänen. Die *framework*-Bereiche sind graublau, die CDR1 jeweils in Rot, CDR2 bzw. HV2 in Grün und CDR3 in Blau dargestellt. Intra-Domänen-Disulfidbrücken in VNARs zwischen CDR3 und entweder CDR1, FR2 oder FR4 sind mit gelben Balken unterhalb der VNAR-Sequenz dargestellt. Positionen mit spezifischen, geladenen Aminosäurereste in VNARS sind mit blauen Kugeln gekennzeichnet.

VNAR-Bindedomänen sind äußerst stabil. Sie tolerieren hohe Konzentrationen an denaturierenden Agenzien. Zudem sind sie in der Lage, nachdem sie hohen Temperaturen ausgesetzt wurden und dabei erwartungsgemäß denaturierten, sich nach Rückführung zu physiologischen Bedingungen zu einem großen Anteil rückzufalten und dabei ihre Bindeeigenschaften beizubehalten <sup>[12]</sup>. Die Bindedomäne VNAR der IgNAR besitzt gegenüber Bindedomänen konventioneller Immunglobulinen eine deutlich höhere Toleranz gegenüber großer Hitze. VNARs verlieren nur sehr langsam an Bindeaktivität, wenn sie Temperaturen von 95 °C exponiert sind. Sie besitzen nach 30 min noch etwa 50 % ihrer ursprünglichen Aktivität, während konventionelle Bindedomänen schon nach 5-10 min vollständigen Aktivitätsverlust zeigen <sup>[13]</sup>. Aufgrund ihrer hydrophilen Oberfläche sind IgNARs zudem sehr gut wasserlöslich <sup>[12]</sup>. All diese Eigenschaften machen IgNARs bzw. deren Bindedomäne VNAR zu einer interessanten Alternative gegenüber konventionellen Bindedomänen.

#### 1.4 VHH-Antikörper (variable domain of the heavy-chain of a heavy-chain antibody)

Die Familie der *Camelidae* (Lamas, Alpakas, Kamele, etc.) besitzt eine besondere Klasse von Antikörpern, die man als Schwerekettenantikörper bezeichnet (HCAbs, Abbildung 5) <sup>[7], [45], [59], [76]</sup>. Diese homodimeren Antikörper besitzen lediglich eine Antigenbindedomäne (VHH) und sind direkt über die *hinge* Region mit dem Fc-Teil verbunden (Abbildung 5). Somit fehlt ihnen sowohl eine leichte Kette, als auch eine CH1-Domäne <sup>[44], [45]</sup>. Die CH1 codierende Sequenz ist noch immer im Genom von Kameliden enthalten, jedoch wird sie während des *splicing*, wahrscheinlich aufgrund einer Punktmutation im *consensus splicing signal* am 3'-Ende des CH1-Exons, entfernt <sup>[77], [78]</sup>.



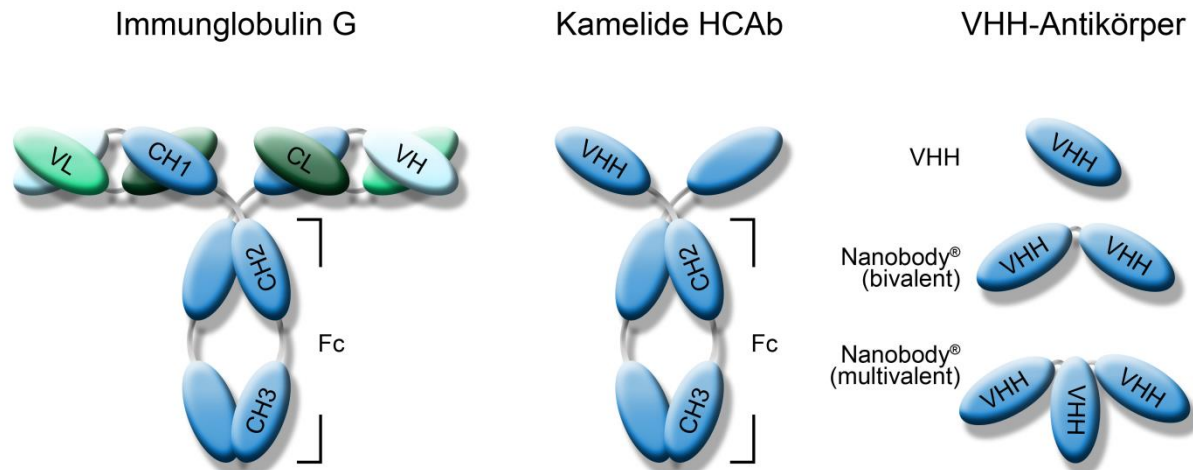


Abbildung 5: Aufbau und Vergleich eines IgG und eines kameliden Schwerkettenantikörpers (HCAb) sowie daraus abgeleiteten VHH-Antikörpern. Singuläres VHH-Fragment (VHH) sowie **bivalente** bzw. **multivalente Nanobodies®**. Die dargestellten Nanobodies® können dabei gegen dasselbe Epitop, verschiedene Epitope desselben Antigens oder gegen verschiedene Antigene gerichtet sein.

Den Verlust der Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit einer leichten variablen Domäne (VL) verdanken die VHH-Domänen einer Reihe von Aminosäuresubstitutionen -welche auch als *hallmarks* bezeichnet werden- im Bereich des *frameworks* 2 (V37F/Y, G44Q/E, L45R/C und W47G/S/L/F), die mit Aminosäureresten in den *frameworks* 2, 3 und 4 (Gln39, Tyr91 und Trp103), ohne Beeinflussung der *framework*-Struktur, eine Veränderung der Oberfläche bewirken (Abbildung 6 und Abbildung 7) [44], [79]. Das  $\alpha$ -Gerüst bleibt bei dieser Neuarrangierung beinahe unverändert, während die Seitenreste besagter Positionen um die Achse ihrer  $C\beta$ - $C\gamma$ -Bindung rotieren und dabei ihre hydrophileren Bereiche exponieren oder hydrophobe Taschen ausfüllen. Zusätzlich bedeckt die CDR3 in VHHs Teile des Bereichs, der in VH-Domänen für die Dimerisierung mit der VL-Domäne verantwortlich ist (Abbildung 7) [44], [79], [80]. Des Weiteren existieren zusätzliche häufig auftretende Substitutionen (P14A, L78V, R83K, A84P und Q108L; siehe Abbildung 6 und Abbildung 7), die jedoch nur einen sehr geringen Einfluss auf die besonderen biophysikalischen Eigenschaften von VHHs haben [70].

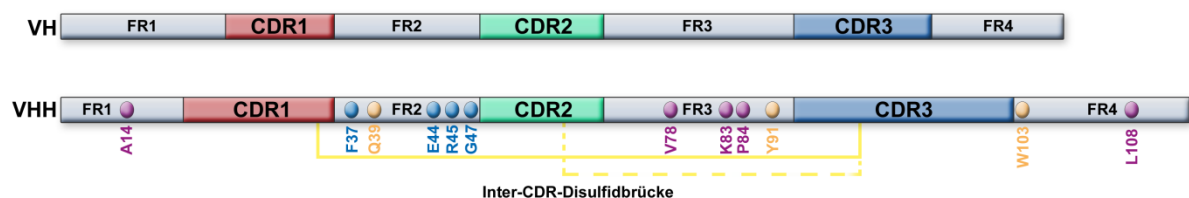


Abbildung 6: Schematischer Vergleich des Aufbaus von VH- und VHH-Domänen. Die *framework*-Bereiche sind graublau, die CDRs jeweils in Rot (CDR1), Grün (CDR2) und Blau (CDR3) dargestellt. Inter-CDR-Disulfidbrücken in VHHs zwischen CDR3 und entweder CDR1 (häufiger) oder CDR2 sind mit gelben Balken unterhalb der VHH-Sequenz dargestellt. Positionen der strukturstabilisierenden Aminosäuresubstitutionen (*hallmarks*) in VHHs sind mit blauen Kugeln gekennzeichnet und entsprechend beschriftet. Zusätzliche, häufig auftretende Substitutionen sind mit lila Kugeln markiert und entsprechend beschriftet. Wichtige, räumliche neuorientierte Aminosäuren sind mit orangenen Kugeln gekennzeichnet und ebenfalls entsprechend beschriftet.

In Sequenzvergleichen zeigen VHH-Domänen eine 80 % Sequenzhomologie mit der humanen VH-Domäne der Familie III. Diese Homologie erzeugt eine nur geringe Immunogenität im menschlichen Organismus und ermöglicht eine einfache Humanisierung von VHHs <sup>[7], [81]</sup>. VHHs werden durch ein eigenes Set (VH V-Gensegmente unabhängig) von V-Gensegmenten (33 einzelne Sequenzen codiert durch 42 Gensegmente) codiert und unterscheiden sich vor allem in der Anzahl an Mutations-*hotspots* sowie DNA Rekombinationssignalsequenzen von VHs <sup>[77], [82]</sup>. Die VHH-Domäne ist mit etwa 15 kDa und einer Dimension von 4 x 2,5 x 3 nm -welche ihm den kommerziellen Namen Nanobody<sup>®</sup> (Ablynx nv, Belgium; Abbildung 5) einbrachte- eine der kleinsten bekannten Antikörperfragmente <sup>[36]</sup>. Sie zeichnet sich durch eine Reihe von positiven Eigenschaften aus, die im Vergleich mit IgG-assoziierten Antikörperfragmenten zu teilweise deutlichen Verbesserungen führen.

So besitzen sie beispielsweise eine verbesserte Löslichkeit im Vergleich mit isolierten VH-Fragmenten <sup>[83]</sup>. VHH-Antikörper werden durch ein einzelnes Exon codiert und sind deshalb molekularbiologisch einfach zu amplifizieren und zu manipulieren <sup>[36]</sup>. Im Vergleich mit Antikörper-Fragmenten (abgeleitet von IgGs) ist die Antigenbindefläche eines VHHs deutlich kleiner. Aufgrund der durchschnittlich längeren CDR3 (Maus = 9, Mensch = 12, Dromedar = 16-18 Aminosäuren <sup>[82], [84], [85]</sup>) ist das Paratop von VHHs jedoch relativ groß (Abbildung 6) und ermöglicht die Bindung schwer erreichbarer Epitope (z. B. Enzym-Taschen und Rezeptoren <sup>[45], [86]</sup>) und Affinitäten gegenüber Antigenen im nanomolaren Bereich <sup>[50], [67]</sup>.

Die CDR1 von VHHs der Dromedare ist ebenfalls um einige Aminosäuren des *framework* 1 verlängert (Abbildung 6) <sup>[82]</sup>. Es existiert jedoch auch ein gewisser Anteil an VHHs in Lamas, die nur über relative kurze CDR3 verfügen und die dennoch ausreichendes Antigen-Bindepotential besitzen <sup>[87], [88]</sup>. VHHs sind sehr stabil im Vergleich zu konventionellen Antikörper-Fragmenten und deshalb ideal für den Einsatz in der Diagnostik <sup>[1], [49], [89]–[92]</sup>. Nach langen Inkubationsphasen bei 37 °C verfügen VHHs noch immer etwa 80 % ihrer ursprünglichen Bindeaktivität <sup>[93]</sup>. Des Weiteren sind sie in der Lage, ihr Antigen noch nach Inkubation bei 90 °C spezifisch zu binden <sup>[94]–[96]</sup>. Diese beiden Eigenschaften von VHHs werden vor allem durch deren Fähigkeit zur Rückfaltung ermöglicht <sup>[97], [98]</sup>, über die VHs nicht verfügen und die in der Regel nach einer solchen Behandlung aggregieren <sup>[98]</sup>. Neben der Toleranz gegenüber hohen Temperaturen zeigen VHHs ein ebenso großes Rückfaltungspotential nach der Denaturierung mittels Guadiniumchlorid oder Harnstoff <sup>[99]</sup>. Unterstützt wird diese hohe Stabilität durch eine Cystein-Bindung zwischen der CDR3 und entweder der CDR1 oder CDR2 in einigen VHHs (Abbildung 6) <sup>[70], [93], [100], [101]</sup>. Aufgrund ihrer geringen Größe sowie ihrer hohen Stabilität sind VHHs beispielsweise für den Einsatz in der Chromatografie und Immun-präzipitation geeignet <sup>[102]</sup>.

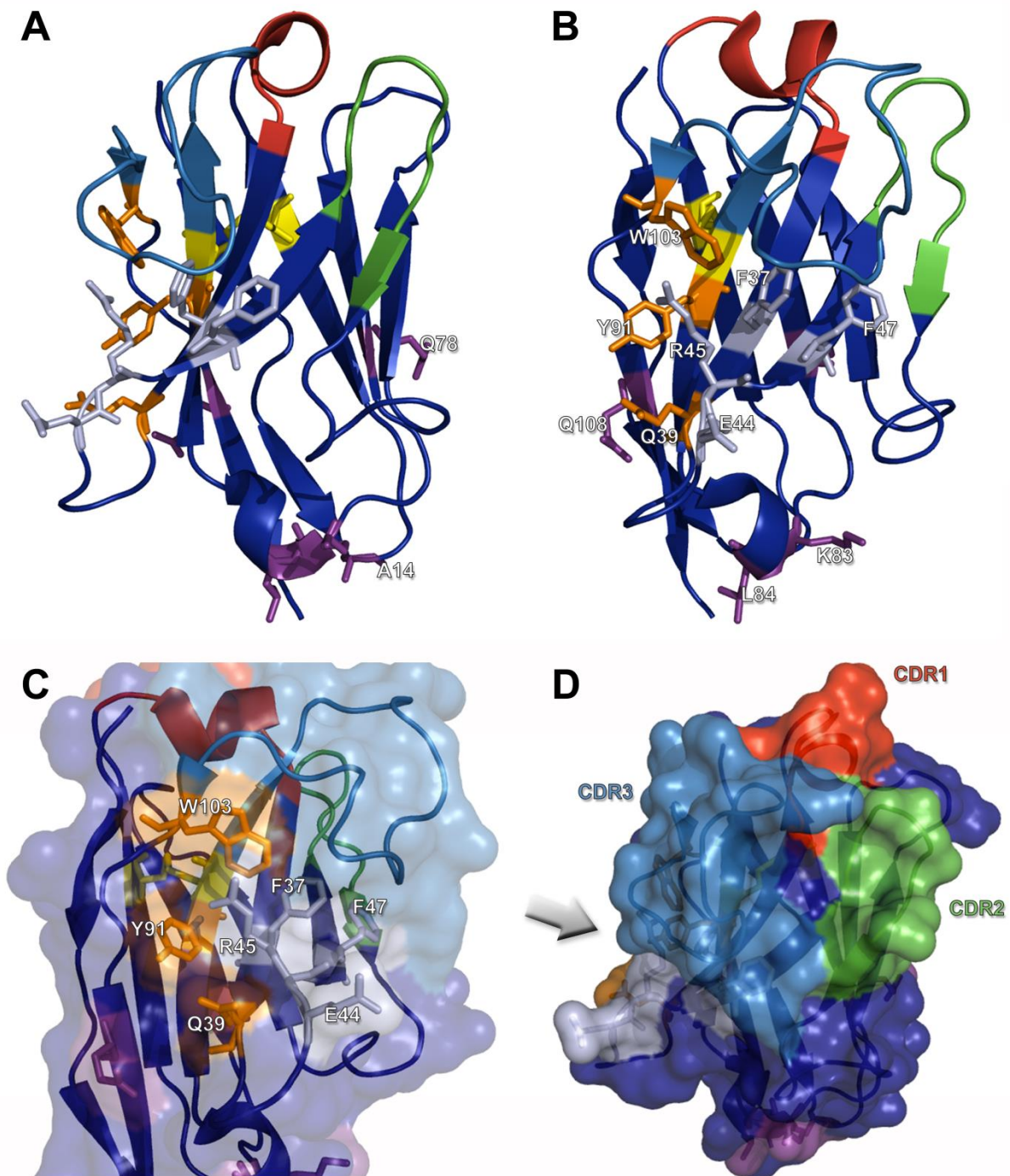


Abbildung 7: Kristallstruktur eines VHH-Antikörpers (PDB-Nummer: 1N8Z). Abbildungen A und B zeigen die  $\beta$ -Faltblattstruktur aus zwei um etwa  $90^\circ$  gedrehten Blickwinkeln. Die CDRs sind farbig markiert (CDR1 = rot; CDR2 = grün; CDR3 = graublau). Spezifische und Aminosäuresubstitutionen (*hallmarks*) sind silbergrau, zusätzliche mögliche Substitutionen lila und mit Substitutionen (*hallmarks*) interagierende sowie neuarrangierte Aminosäuren orange gefärbt, als Stabmodell dargestellt und entsprechend beschriftet. Abbildung C zeigt den Bereich, der in VH-Domänen für die Interaktion mit VL-Domänen verantwortlich ist. *Hallmarks* und interagierende Aminosäuren sind hier ebenfalls entsprechend (wie in A und B) gekennzeichnet und beschriftet. D zeigt die Oberfläche des VHHs mit Blick auf das Paratop. Die farblich markierten CDRs sind zusätzlich beschriftet. Strukturen erstellt mit Pymol™ (DeLano Scientific LLC).

Die Erstellung von VHH-Variantenbibliotheken kann auf Grundlage verschiedener Ressourcen geschehen. Neben synthetischen oder semi-synthetischen Bibliotheken wird auf das genetische Antikörperrepertoire von nicht-immunisierten sowie immunisierten Kameliden zugegriffen. Die Affinitäten von VHHs, welche aus einer Immun-Bibliothek isoliert wurden, liegen in der Regel im nanomolaren Bereich <sup>[66], [67], [103]–[107]</sup>. Dagegen besitzen aus synthetischen und nicht-immunisierten Bibliotheken isolierte VHHs oft mikromolare Affinitäten <sup>[100], [108]–[111]</sup> und müssen meist anschließend zunächst mit geeigneten *in vitro* oder *in vivo* Methoden optimiert werden <sup>[19], [95], [112]</sup>. Synthetische oder nicht-immunisierte VHH-Bibliotheken stellen dennoch eine ausgezeichnete Alternative gegenüber Immun-Bibliotheken dar, um beispielsweise aus einer einzelnen Bibliothek Binder gegen eine große Anzahl an Antigenen zu isolieren oder wenn das Antigen limitiert bzw. nicht immunogen oder gar toxisch für das Tier ist <sup>[69]</sup>.

---

## 1.5 VHH-Antikörper als Biopharmazeutika

---

Nachdem die Struktur und die spezifischen physikalischen Eigenschaften von VHH-Antikörpern in den vergangenen 20 Jahren untersucht und genau beschrieben wurden <sup>[7], [45], [59], [76]</sup>, ist die Zahl der publizierten monoklonalen VHH-Antikörper mit spezifischen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten in der letzten Dekade deutlich gewachsen <sup>[45], [113]</sup>. Tabelle 1 zeigt verschiedene Beispiele von isolierten VHH-Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene oder Viren. Auffällig ist, dass die Durchmusterungen dabei bislang fast ausschließlich mittels *phage display* durchgeführt wurden. Die Auflistung zeigt ebenfalls die Herkunft der VHH-DNA (naives oder immunisiertes Repertoire) und die gemessenen Affinitätskonstanten ( $K_D$ ). Die Angaben zu den monovalenten Affinitäten der VHH-Antikörper aus naiven Repertoires liegen im Bereich zwischen 0,45–7,75  $\mu$ M. Trotz der relativ niedrigen Affinitäten zeigen die VHH-Antikörper in den einzelnen Studien hohe Antigen-spezifische Aktivitäten und besondere Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise eine Überquerung der Blut-Hirn-Schranke <sup>[114], [115]</sup> oder die Bindung von Haptenen <sup>[109][116]</sup>. Beispiele aus immunisierten Repertoires zeigen Affinitäten im ein-bis dreistelligen nanomolaren Bereich und häufig Virus-neutralisierende Eigenschaften (Tabelle 1) <sup>[117]</sup>.

Tabelle 1: Liste verschiedener publizierter VHH-Antikörper.

Antigen / Zielprotein	Kamelid / Quelle	Anwendung	Affinität / <i>in vitro</i> Da- ten	Methode zur Isolie- rung	Referenzen
ED84 monokl. Maus-Anti- körper	Immunisiertes Lama	Molekulares Mimikry	$K_D = 114-155$ nM	<i>phage display</i>	[118]
Picloram	Naives Lama- Repertoire	Detektion von Hap- tenen	$K_D = 3,0-7,6$ $\mu$ M	<i>ribosomal</i> <i>display</i>	[109]
HIF-1 $\alpha$	Naives Lama- Repertoire	Hypoxie; Studien an HIF-1 $\alpha$	$K_D =$ Monomer: 0,45-7,75 $\mu$ M; Dimer: 0,09 $\mu$ M	<i>phage display</i>	[110]
$\alpha$ -2,3-Sialinsäure	Naives Lama- Repertoire	Überqueren der Blut-Hirn-Schranke	Akkumulierung auf Hirn-Endo- thelzellen	<i>phage display</i>	[114], [115]
EGFR	Immunisiertes Trampeltier und Dromeda		$K_D = 20$ nM und 30 nM	<i>phage display</i>	[1], [91], [92], [119]
EGFR	Immunisiertes Lama		$K_D = 40$ nM	<i>phage display</i>	[120]
Respiratorische- Synzytial-Virus	Immunisiertes Lama	Virus- neutralisierend	$K_D = 0,45-9,24$ nM; $IC_{50} =$ bis 0,11-nM	<i>phage display</i>	[117]
Rabiesvirus	Immunisiertes Lama	Virus- neutralisierend	$IC_{50} =$ bis 0,14 nM	<i>phage display</i>	[117]
H5N1 Influenza Virus	Immunisiertes Lama	Virus- neutralisierend	$K_D = 9,91-30,1$ nM; $IC_{50} =$ bis <1 nM	<i>phage display</i>	[117]

Darüber hinaus wurde durch die Fa. Ablynx (Ablynx nv, Belgium) die Entwicklung von zurzeit etwa neun VHH-Antikörper-Projekten bereits bis in die klinischen oder präklinische Phasen gebracht (Tabelle 2; [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com)) <sup>[121]</sup>. Zusätzlich sind mindestens 16 Projekte in der Entwicklungsphase. Einige dieser VHH-Antikörper besitzen sehr hohe Affinitäten im



sub-pikomolaren Bereich (Tabelle 2, ALX-0061; [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com)). Einen großen Affinitäts- sowie Halbwertszeit-Vorteil wird bei diesen Produkten durch die Bildung von Di- und Trivalenzen generiert. Die erhöhte Halbwertszeit wird dabei durch die Bindung von Serumalbumin gewonnen (Tabelle 2; [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com)). Bei einigen dieser Studien sind Kooperationspartner aus der Pharma-Branche involviert (Merck Serono, AbbVie, Eddingpharm, Merck & Co., Boehringer Ingelheim und Novartis). Das große Interesse sowie die hohen Investitionen deuten auf ein hohes Potential dieser Biomoleküle hin.

Tabelle 2: Überblick des momentanen Nanobody®-Repertoires der Firma Ablynx ([www.ablynx.com](http://www.ablynx.com) / Stand 09.2014). nb=nicht beschrieben.

Antigen / Zielprotein	Name Produkt	Therapeutischer Bereich	Entwicklungsphase	Besonderheit
vWF	Caplacizumab	Hämatologie	Klinische Phase II	Zur Therapie von Thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura
TNF $\alpha$	Ozoralizumab	Inflammation / Immunologie /	Klinische Phase II	Trivalent und bispezifisch; bindet Serumalbumin für verlängerte Halbwertszeit
nb	Verschiedene	Infektion	Entwicklungsphase	
nb	Verschiedene		Entwicklungsphase	
nb	Verschiedene	Onkologie	Entwicklungsphase	
nb	Verschiedene		Entwicklungsphase	
RSV	ALX-0171	Pulmologie	Klinische Phase I	Trivalent; bindet und neutralisiert Respiratorische-Synzytial-Viren (RSV); Applikation durch Inhalation.
nb	verschiedene		Entwicklungsphase	
nb	verschiedene		Entwicklungsphase	
nb	nb	Ophthalmologie / Auge	Entwicklungsphase	
nb	nb	Inflammation /	Entwicklungsphase	
nb	nb	Immunologie	Entwicklungsphase	

<b>nb</b>	nb		Entwicklungsphase	
<b>nb</b>	verschiedene	Onkologie / Neurologie	Entwicklungsphase	
<b>nb</b>	verschiedene	/ Immunologie	Entwicklungsphase	
<b>IL-17/IL-17A</b>	ALX-0761		Klinische Phase I	Bispezifisch; verlängerte Halbwertszeit; neutralisiert IL-17A und IL-17F.
		Immunologie / Inflammation		
<b>IL-6R</b>	ALX-0061		Klinische Phase II	Bispezifisch; bindet Serumalbumin für verlängerte Halbwertszeit; $K_D=0,19$ pM.
<b>RANKL</b>	ALX-0141	Knochenerkrankungen	Präklinische Phase (China)	Trivalent und bispezifisch; bindet Serumalbumin für verlängerte Halbwertszeit.
<b>nb</b>	nb	Neurologie	Entwicklungsphase	
<b>nb</b>	ALX-0751	Onkologie	Präklinische Phase	
<b>nb</b>	nb		Präklinische Phase	
<b>nb</b>	nb	Pulmologie	Entwicklungsphase	
<b>nb</b>	nb	verschiedene	Präklinische Phase	
<b>nb</b>	nb		Entwicklungsphase	
<b>nb</b>	verschiedene	Immunonkologie	Entwicklungsphase	

## 1.6 Durchmusterung von Varianten-Bibliotheken im Hochdurchsatz

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, aus seinem enormen Antikörperrepertoire mit über  $10^{11}$  potentiell möglichen Varianten, in sehr kurzer Zeit Antigen-bindende Antikörper zu selektieren und dabei sogar zu optimieren<sup>[35]</sup>. Seit Jahrzehnten arbeiten Wissenschaftler an der Entwicklung von Durchmusterungsmethoden zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern sowie Antikörperfragmenten, um sich diese Vorteile zunutze zu machen<sup>[35], [122]</sup>. Nach der Entdeckung der Hybridomatechnologie im Jahre 1975 wurde im Jahre 1989 die erste rekombinante Methode zur Klonierung von Antikörperfragment-Bibliotheken (scFv bzw. Fab) aus Lymphozyten in Bakterien etabliert<sup>[38], [39], [123]</sup>. Der nächste Meilenstein wurde in den Jahren 1985 bis 1990 mit der erfolgreichen Expression von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche

filamentöser Phagen erreicht <sup>[38], [40], [124]</sup>. Das *phage display* ermöglichte es, effizient Antikörper aus rekombinanten Bibliotheken zu isolieren <sup>[41]–[43], [125]</sup>. Bereits sechs Jahre später wurde eine analoge Methode, das *yeast display*, zur Oberflächenexpression und Durchmusterung in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) entwickelt <sup>[126], [127]</sup>. Dieses eukaryotische Expressions- und Durchmusterungssystem wurde seitdem in verschiedenen Hefen mit unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien weiterentwickelt <sup>[128]–[134]</sup> und ermöglichte die Isolierung von Antikörpern mit Affinitäten bis in den femtomolaren Bereich <sup>[135]</sup>.

---

### 1.6.1 Phagen-Oberflächenpräsentation (*phage display*)

---

Die *phage display* Technologie, welche zwischen 1985 und 1990 entwickelt wurde, ist die älteste Selektionsplattform für molekulare Varianten-Bibliotheken <sup>[38], [40], [124], [136]</sup>. Mit dieser Technologie konnten bereits 1991 die ersten monoklonalen Antikörper aus Variantenbibliotheken isoliert werden <sup>[41]–[43]</sup>. Sie ist noch immer die am häufigsten verwendete Technologie zur Isolierung von Peptiden und Antikörpern <sup>[125], [136]</sup>.

Bei der Antikörper-Präsentation auf der Oberfläche von Phagen -in der Regel f1-, fd- oder M13-Phagen- werden die Antikörper-codierenden Gensequenzen genetisch an die Gensequenz eines Phagen-Hüllproteins fusioniert. Meist wird für die Fusion das Gen III genutzt, das für das Hüllprotein pIII codiert <sup>[136]</sup>. Das Protein pIII ist in die bakterielle Infektion bei der Bindung des F-Pilus involviert und ist auf der Phagenhülle in drei- bis fünffacher Kopie vorahnden <sup>[136]</sup>. Neben der Verwendung des pIII Proteins wurde ebenfalls das Hüllprotein pVIII als Fusionprotein eingesetzt, das in bis zu 2700 Kopien auf der Phagenhülle vorkommt, jedoch deutlich ineffizienter bei der Durchmusterung ist <sup>[136], [137]</sup>. Zu Beginn verwendete man Phagenvektoren, die jedoch geringe Transformationseffizienzen zeigten <sup>[124]</sup>. Heutzutage werden optimierte *phagemid*-Vektoren eingesetzt, die über einen M13-sowie beispielsweise einen pUC-Replikationsursprung besitzen und deutliche verbesserte Transformationsausbeuten aufweisen <sup>[42], [138]</sup>. Auf *phagemid*-Vektoren sind jedoch nicht die Informationen für die restlichen Hüllproteine des Phagen codiert. Somit benötigt man neben einem F-Plasmid tragenden *E. coli* Stamm einen Helferphagen (z. B. M13K07 oder VCS-M13), welcher alle benötigten Hüllprotein-Gene liefert, jedoch einen defekten Replikationsursprung trägt. Dieser spezielle Replikationsursprung ist nötig, um bei der Amplifikation neuer Phagen die Verpackung des *phagemids* zu favorisieren. Auf diese Weise hergestellte Phagen tragen ein *phagemid* und das darauf codierte Antikörper-Protein auf seiner Oberfläche als pIII-Fusion in bis zu fünffacher Ausführung.

Die für die Durchmusterung von Varianten-Bibliotheken verwendeten Antikörper-Formate sind in der Regel Fabs oder scFvs <sup>[136]</sup>. Darüber hinaus wurden bereits Formate mit dimeren oder oligomeren Antikörper-Fragmenten mit bivalenten Antigen-Spezifitäten auf Phagen erzeugt <sup>[139]–[142]</sup>. Möglichkeiten, Vollängen-IgGs auf Phagen in ausreichender Qualität und Stabilität zu präsentieren sowie im Anschluss für die Durchmusterung einzusetzen, sind bislang unzureichend und werden nur in Ansätzen genutzt <sup>[143]</sup>. Für Antikörper-Fragmente gilt die



*phage display* Technologie jedoch als sehr robust, vielseitig einsetzbar <sup>[35]</sup> und ist Ursprung zahlreicher hochaffiner Antikörperfragmente mit Affinitätskonstanten im pikomolaren Bereich <sup>[144]–[146]</sup>. Mit ihr sind die Erstellung und Durchmusterung von Varianten-Bibliotheken in Größenordnungen von  $10^{10}$  bis  $10^{11}$  möglich <sup>[35]</sup>.

---

### 1.6.2 Hefe-Oberflächenpräsentation (*yeast display*)

---

Mit der Entwicklung der Hefe-Oberflächenpräsentation (*yeast display*) wurde ein eukaryotischer Organismus zur Expression und Durchmusterung durch Kopplung von Genotyp und Phänotyp im Hochdurchsatz eingeführt <sup>[126], [127]</sup>. Für die Durchmusterung werden in der Regel magnetische- oder fluoreszenzaktivierte Zellsortierungsmethoden (MACS bzw. FACS) eingesetzt <sup>[147]</sup>. Die Phänotyp-Kopplung erfolgt dabei auf unterschiedliche Weise. Eine der häufigsten Methoden ist die Verankerung des zu präsentierenden Antikörperfragments auf der Zellwand der Hefe durch genetische Fusion an ein Hefe-Zellwandprotein mit GPI-Ankersignal. Diese GPI-Ankerproteine sind kovalent mit  $\beta$ -Glucanen verbunden und lokalisieren die zu präsentierenden Antikörper in ausreichendem Abstand von der Zellwand <sup>[148], [149]</sup>. Neben GPI-Proteinen wie Flo1p <sup>[131], [150], [151]</sup> und Pir1p <sup>[152]</sup> aus *Pichia pastoris* sowie Cwp2p <sup>[130]</sup>, Sed1p und  $\alpha$ -Agglutinin <sup>[131]–[133], [153]–[155]</sup> aus *Saccharomyces cerevisiae*, ist das  $\alpha$ -Agglutinin eines der zuerst verwendeten und bekanntesten Vertreter der Hefe-Ankerproteine (Abbildung 8) <sup>[126], [127]</sup>.

Das Zellwandprotein  $\alpha$ -Agglutinin gehört zu den paarungstypspezifischen Agglutinin-Adhäsionsproteinen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und ist mit seinem Widerpart  $\alpha$ -Agglutinin für die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten zwischen haploiden Hefezellen verantwortlich. Dieser Paarungsvorgang zweier haploider Hefen zu einer diploiden Zygote wird auch *mating* genannt <sup>[148], [156]</sup>. Das Protein  $\alpha$ -Agglutinin setzt sich aus den beiden Untereinheiten Aga1p und Aga2p zusammen welche über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Untereinheit Aga1p trägt das GPI-Ankersignal und ist somit für die Zellwandverankerung zuständig <sup>[148]</sup>. Die Untereinheit Aga2p, welche für die Interaktion mit dem komplexen Ankerprotein  $\alpha$ -Agglutinin zuständig und über Aga1p an der Zellwand gekoppelt ist, kann nun für die Exponierung heterologer Proteine genutzt werden (Abbildung 8). Hierfür wird das zu präsentierende Protein genetisch, unter Verwendung eines geeigneten Expressionsvektors, C-terminal an Aga2p fusioniert (Abbildung 8 B) <sup>[126], [127], [157]</sup>. Um die Zellwandverankerung zu gewährleisten wird ein Hefestamm verwendet, der eine chromosomal integrierte Aga1p Expressionskassette trägt (Abbildung 8 A) <sup>[126], [127], [157]</sup>. Die Transkription beider Genkassetten wird jeweils durch einen Gal-Promotor reguliert, welcher durch Glukose reprimiert und Galaktose induziert werden kann <sup>[126], [127], [158]–[160]</sup>.

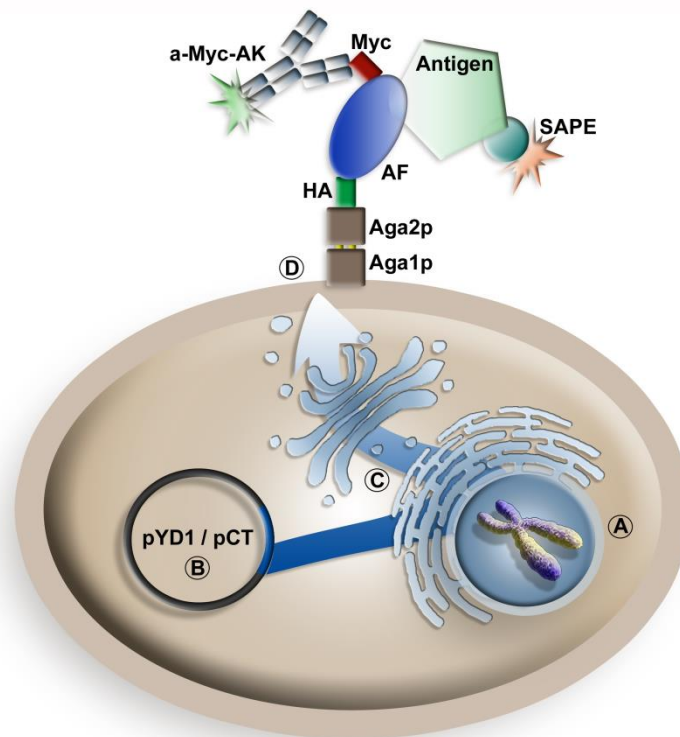


Abbildung 8: Schematische Darstellung des a-Agglutinin-Systems zur Oberflächenpräsentation von Antikörper-Fragmenten nach Boder und Wittrup. Der Hefestamm *S. cerevisiae* EBY100 besitzt eine chromosomal integrierte Aga1p-Expressionskassette (A). Die Untereinheit Aga2p ist auf dem Plasmid pYD1 bzw. pCT als Fusion mit einer Genkassette, bestehend aus den Genen für ein Antikörper-Fragment (AF) sowie zwei flankierende Epitop-Tags (HA und Myc), codiert (B). Die Initiation der Genexpression (Addition von Galaktose) führt zur Integration des Aga1p, welche durch zwei Disulfidbrücken (dargestellt durch zwei gelbe Balken) mit der Aga2p-Untereinheit verbunden ist, in die Zellwand (D). Durch genetische Fusion an die Untereinheit Aga2p werden dadurch das Antikörper-Fragment (AF) und die flankierenden Epitops-Tags (HA bzw. Myc) immobilisiert sowie exponiert. Eine durchflusszytometrische Detektion der Hefezelle kann anschließend durch immunchemische Fluoreszenzmarkierung der Epitop-Tags (Beispiel Anti-Myc-AK) oder mittels Antigenbindung (Antigen + SAPE) durch das Antikörper-Fragment erfolgen.

Auf diese Weise klonierte und in Hefezellen exprimierte Antikörper-Fragmente werden auf der Oberfläche der Hefen exponiert und können entweder über flankierende Epitop-Tags (z. B. Hämagglutinin-Tag oder Myc-Epitop-Tag) oder spezifische Antigenbindung durchflusszytometrisch detektiert und Antikörper-Repertoires in Form von Varianten-Bibliothek durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung durchmustert werden <sup>[126]–[129]</sup>. In dieser Arbeit wurde das Plasmid pCT (2.5.2) sowie der Hefestamm EBY100 (2.1) für die Generierung von VHH-Varianten-Bibliotheken und anschließende Durchmusterung eingesetzt. Das Plasmid pYD (2.5.5) wurde im Rahmen einer Anleitung der Diplomarbeit von Karina Winterling sowie für eigene weiterführende Projekte verwendet.

## 1.7 Verwendete Antigene

Für die Durchmusterung der VHH-Bibliotheken in Hefen wurde eine Reihe von Antigenen aus verschiedenen Bereichen der Therapeutik, Klassifizierung und Erforschung infektiöser Krankheiten eingesetzt, um spezifische monoklonale VHH-Antikörper zu isolieren. Einige der Antigene wurden außerdem für die Immunisierung eines Lamas eingesetzt, um anschließend eine VHH-Bibliothek in Hefen für die Isolierung von hochaffinen Bindemolekülen zu generieren.

Das humane C4b Bindeprotein, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Kolmar bereits näher charakterisiert wurde <sup>[161]</sup>, ist Teil der Komplementkaskade. Es ist ein Plasma Glykoprotein-Komplex mit einem Molekulargewicht von 570 kDa und wird hauptsächlich in der Leber produziert. C4bp fungiert als Inhibitor der Komplementaktivierung <sup>[161]</sup>. Es besitzt Potential für die Klassifizierung von Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) sowie der Prognose und der Optimierung bei Behandlungen <sup>[162]</sup>.

Zur Erforschung und Prävention der Infektion von *Anopheles gambiae* durch Malaria Plasmodium Sporozysten wurde das potentiell involvierte Protein Saglin für die Durchmusterung eingesetzt. Saglin ist ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Homodimer mit einem Molekulargewicht von 100 kDa <sup>[5], [163]</sup>. Saglin könnte zukünftig von großem Interesse für die Erforschung zur Verhinderung der Übertragung von Malaria sein <sup>[5], [163]</sup>.

Der Großteil der verwendeten Antigene ist jedoch direkt mit Krebserkrankungen assoziiert. Der Ephrin-Rezeptor A2, welcher zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört, ist Teil des Regulatorischen Systems, das für Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Motilität zuständig ist <sup>[3]</sup>. Ephrin-Rezeptoren werden in EphA- und EphB-Kinasen klassifiziert. Abnormale Überexpression dieser Ephrin-Rezeptoren ist charakteristisch für verschiedene humane Krebserkrankungen <sup>[3]</sup>. Ephrin-A-Rezeptoren sind in zahlreiche Typen von malignen Tumoren (z. B. gastrointestinale und kolorektale Tumore) involviert und gelten als potentiell Target in der Krebstherapie <sup>[3]</sup>.

B7-H3 (CD276), ein Zelloberflächenprotein, gehört zu der B7-Familie und wird zu den co-regulierenden Faktoren der Antigen-spezifischen T-Zell-Immunantwort gezählt <sup>[4]</sup>. B7-H3 wird in Kopf- und Nacken-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (SCC=*squamous-cell carcinoma*) wie beispielsweise Hypopharynx-SCC-Zelllinien überexprimiert <sup>[4]</sup>. Es wird mit der Hypopharynx-SCC-Progression, der Tumor-Metastasierung und der Negativregulierung von T-Zell-vermittelter Tumor-Immunantwort in Verbindung gebracht <sup>[4]</sup>.

Ein weiteres Molekül, das bereits seit längerem im Fokus der Krebstherapie steht, ist der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR=*epidermal growth factor receptor*). EGFR ist eine Transmembran-Tyrosinkinase, die durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$  (Transformierende Wachstumsfaktor  $\alpha$ ) oder EGF (Epidermale Wachstumsfaktor) stimuliert wird. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors begünstigt verschiedene tumorbildende Prozesse. Sie führt zur Stimulierung der Zellproliferation, der Angiogenese, der Metastase und zum Schutz der Zelle vor Apoptose <sup>[164]</sup>. Viele Typen von soliden Tumoren zeigen erhöhte Mengen an EGFR und dessen Liganden. Der Einsatz von verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen den

EGF-Rezeptor gerichtet sind, zeigte eine Inhibition der EGF-induzierten Zellproliferation <sup>[165]</sup>. Ein Beispiel ist Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), ein chimärer (das Fv-Fragment stammt aus einem murinen Antikörper) monoklonaler Antikörper, der spezifische und hochaffine Bindeeigenschaften gegenüber dem EGF-Rezeptor besitzt <sup>[165]</sup>. Aufgrund dessen kann eine Liganden-Bindung (TGF- $\alpha$  und EGF) und die dadurch vermittelte Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domänen blockiert werden, welche zu den gesteigerten Zellaktivitäten führt <sup>[165]</sup>.

P-Cadherin (plazentales Cadherin) ist ein in Brustkrebszellen überexprimiertes Protein. Es gehört neben N-Cadherin (neurinales Cadherin) oder E-Cadherin (epitheliales Cadherin) zu den Cadherinen <sup>[166]</sup>. Diese transmembranen Glykoproteine vermitteln Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion <sup>[2]</sup>. Es wird während der Entwicklung transient in verschiedenen Gewebetypen exprimiert, in Adulten ist seine permanente Expression jedoch auf das Epithel beschränkt. Es wird vermutet, dass P-Cadherin eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Brustdrüsen einnimmt. Bei Brustkrebs kann P-Cadherin die Zellinvasion sowie die Aggressivität des Tumors fördern <sup>[2]</sup>. P-Cadherin ist zudem in der frühen Entwicklung von Ovarialkarzinomen (*epithelial ovarian cancer*) involviert und fördert die Tumorzellmigration. In diesem Zusammenhang erleichtert es *in vitro* den Zusammenschluss von freischwimmenden EOC-Zellen (*epithelial ovarian cancer cells*) zu Aggregaten und inhibiert einen programmierten Zelltod (Anoikis) <sup>[167]</sup>.

---

## 1.8 Zielsetzung

---

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erstellung und Durchmusterung von VHH-Varianten-Bibliotheken auf Basis des genetischen Materials von *Lama glama*. Es wird beschrieben, wie die genetische Information, gewonnen aus den isolierten Lymphozyten des Blutes von adulten Lamas, genutzt wurde, um VHH-Fragmente zu amplifizieren und in dafür geeignete Vektoren zur Oberflächenpräsentation zu klonieren. Dabei wurden genetische Pools aus immunisierten und nicht immunisierten Tieren verwendet. Der erste Teil der Arbeit bestand darin, eine naive -also aus dem genetischen Material der nicht immunisierten Lamas-VHH-Varianten-Bibliothek für die Präsentation auf Phagen zu erstellen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand jedoch die im Anschluss beschriebene Generierung einer naiven sowie immunisierten -also aus dem genetischen Material eines immunisierten Lamas-VHH-Varianten-Bibliothek für die Präsentation auf der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die anschließende Durchmusterung nach monoklonalen VHH-Antikörpern mit spezifischen Bindeeigenschaften gegen ausgewählte Antigene. Nach der Integration der VHH-DNA in den dafür vorgesehenen Vektor, wurden die Varianten-Bibliotheken zunächst validiert. Im Anschluss werden anhand einzelner Beispiele die Isolierung von spezifischen VHH-Antikörpern aus den beiden Bibliotheken und die nähere Charakterisierung beschrieben.

Es konnte dabei gezeigt werden, dass es möglich ist, aus der VHH-Varianten-Bibliothek in Hefen ohne vorherige Immunisierung spezifische Bindemoleküle gegen multiple Antigene mit Affinitäten im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich zu isolieren. VHH-

---

Antikörperfragmente mit vergleichbaren Eigenschaften, isoliert aus Phagen-Bibliotheken, wurden bereits mehrfach beschrieben (vergleiche 1.4 und 1.5). Die Nutzung der naiven Bibliothek soll als kostengünstige Alternative gegenüber häufigen Immunisierungen von Versuchstieren dienen. Zudem ist eine einfache Blutentnahme für die Erstellung einer naiven Bibliothek gegenüber einer mehrwöchigen Immunisierung deutlich wenig invasiv. Dieses Format einer VHH-Antikörper-Bibliothek stellt eine ausgezeichnete Ressource zur Isolierung von Bindemolekülen gegen theoretisch jedes Antigen dar.

Anhand des alternativen Formats mit vorangegangener Immunisierung sollte die Möglichkeit einer bereits beschriebenen komplexeren Immunisierung überprüft werden, bei der für die Injektion gleichzeitig mehrere Antigene verwendet werden (Multipleximmunisierung). Auf diese Weise würde die Frequenz der Immunisierungen deutlich verringert, was eine ebenso wirtschaftliche wie ethische Verbesserung mit sich bringt. Auch konnten VHH-Antikörper gegen die eingesetzten Antigene angereichert werden. Dies gelang bereits nach ein bis zwei Sortierungsrunden und somit deutlich schneller und effektiver als mit dem naiven Repertoire. Es zeigte sich demnach, dass eine Immunisierung mit mehreren Antigenen durchführbar ist und es zur Anreicherung von Antikörpern gegen alle anschließend getesteten Antigene durch das Immunsystem des Versuchstiers kam.

Im letzten Teil dieser Arbeit wird die Optimierung der VHH-Produktion sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Zu Beginn der Arbeiten stand kein geeignetes Expressionssystem zur Verfügung, weshalb es von großem Interesse war, idealerweise verschiedene Expressionsformate zu etablieren.



## 2 Materialien

### 2.1 Bakterien- und Hefestämme

#### *Escherichia coli:*

##### **BL21(DE3)** <sup>[168]</sup>

[fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B  
int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

##### **DH5α** <sup>[169], [170]</sup>

[F'φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup> phoA supE44λ<sup>-</sup>  
thi-1 gyrA96 relA1]

##### **BMH71-18** <sup>[171], [172]</sup>

[Δ(lac-proAB), supE, thi, F' lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>]

##### **ER2738** <sup>[173], [174]</sup>

[F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ (lacZ)M15 zzf::Tn(Tet<sup>R</sup>)/ fhuA2 gln V Δ (lac-proAB) thi-1 DDD(hsdS-  
mcrB)5[

##### **JM109** <sup>[175]</sup>

[(F' traD36 lacI<sup>Q</sup> ΔlacZ(M15) proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>) mcrA Δ(lac-proAB) thi-1 gyrA96 endA1 hsdR17 relA1  
supE44 recA1]

##### **Top 10** (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA)

[F- mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139Δ(ara-leu)7697 galU  
galK rpsL endA1 nupG]

#### *Saccharomyces cerevisiae:*

##### **EBY100** <sup>[127]</sup>

[MATa AGA1::Gal1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ 200 pep4::HIS3 prb1Δ 1.6R can1  
GAL], Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>

## 2.2 Neuweltkamelide

### *Lama glama* (Lama)

Für die Blutentnahme zur Generierung der naiven VHH-Bibliothek wurden 12 adulte Tiere einer Herde des Versuchsguts Relliehausen der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Blutentnahme entsprach einer regelmäßigen Kontrolle zur Erstellung eines Blutbildes und erfolgte vor Ort. Eine nachträgliche Beobachtung der Tiere war nicht von Nöten, wurde jedoch trotzdem für etwa eine Std nach Punktierung durchgeführt.

Die Immunisierung des Lamas „Masko“ sowie die Entnahme der Blut- und Serum-Proben wurden ausschließlich durch die Fa. Preclinics (Potsdam, Deutschland) durchgeführt.

## 2.3 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

### 2.3.1 DNA-Längenstandards für die DNA-Elektrophorese

DNA-Längenstandards wurden mit Aqua bidest und DNA-Ladepuffer entsprechend den Herstellangaben eingestellt und bei 4 °C gelagert.

#### 2.3.1.1 Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13 (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien)

Der *Lambda DNA/Eco47I (AvaII) Marker, 13* enthält vollständig mit *Eco47I* verdaute Lambda DNA. Das Restriktionsprodukt resultiert dabei in 36 definierte Fragmente (Abbildung 9), die gereinigt und in *storage buffer* gelöst vorliegen. Die einzelnen Fragmente haben folgende Längen in Basenpaaren (bp):

8.126 | 6.555 | 6.442 | 3.676 | 2.606 | 2.555 | 2.134 | 2.005 | 1.951 | 1.611 | 1.420 | 1.284 | 985 | 974 | 894 | 597 | 590 | 513 | 511 | 433 | 398 | 345 | 310 | 308 | 272 | 242 | 215 | 151 | 88 | 73 | 67 | 45 | 42 | 32 | 29 | 23

#### 2.3.1.2 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

Für die Herstellung des 2-log DNA Ladder wurden verschiedene Plasmide bis zur Vollständigkeit verdaut, mittels Phenol-Extraktion gereinigt und in TE-Puffer aufgenommen. Die so entstandenen 19 Fragmente (Abbildung 9) ergeben nachstehendes Basenlängen-Muster in Kilobasen (kb), wobei die Fragmente mit den Basenlängen 0,5 kb, 1,0 kb und 3,0 kb in erhöhter Konzentration als Referenz-Punkte enthalten sind:

10 | 8 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1,5 | 1,2 | 1,0 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1



### 2.3.1.3 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

Die Herstellung dieses DNA-Markers basiert auf dem vollständigen Verdau einer Reihe von Plasmiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Daraus resultieren 12 Banden im Bereich zwischen 100 und 1.517 bp (Abbildung 9). Die Banden bei 500 und 1.000 Basenpaaren (bp) sind intensiviert. Im Einzelnen ergeben sich folgende Bandenlängen:

100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1.000 | 1.200 | 1.517

### 2.3.1.4 O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range, ready-to-use (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien)

Der O'GeneRuler™ DNA Ladder ist aus einem Gemisch 11 individueller DNA-Fragmente zusammengesetzt (Abbildung 9), die zuvor chromatographisch gereinigt und für den sofortigen Gebrauch in GeneRuler™ Storage and Loading Buffer gelöst wurden. Die einzelnen Fragmente haben nachfolgende Längen in Basenpaaren (bp):

300 | 200 | 150 | 100 | 75 | 50 | 35 | 25 | 20 | 15 | 10

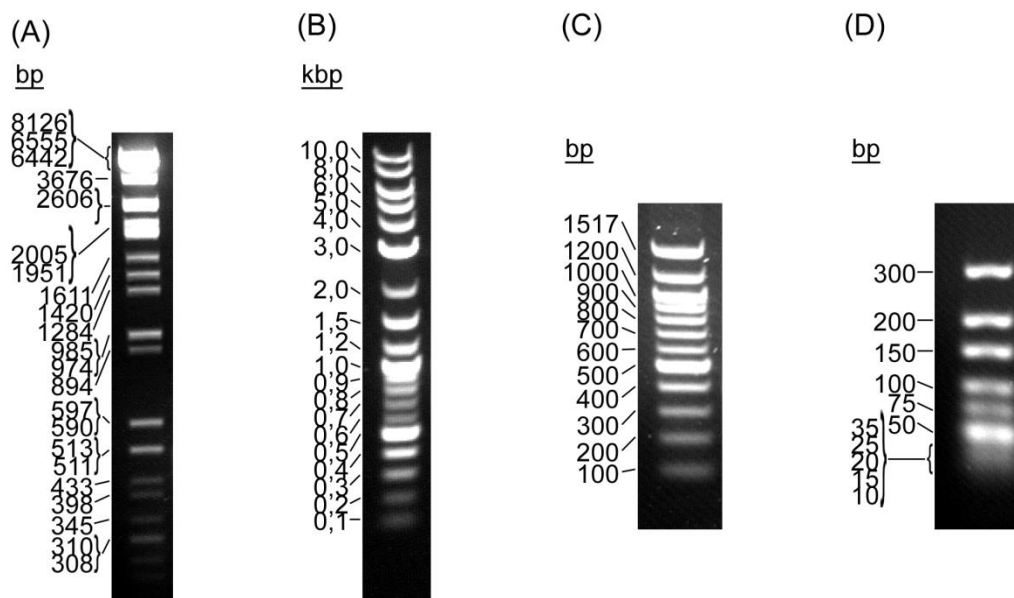


Abbildung 9: Verwendete DNA Marker: (A) Lambda DNA Marker, 13 (2.3.1.1), (B) 2-Log DNA Ladder (2.3.1.2), (C) 100 bp DNA Ladder (2.3.1.3), (D) O'Gene Ultra Low Range (2.3.1.4).

---

## 2.3.2 Molekulargewichtsmarker für die Proteinelektrophorese

---

### 2.3.2.1 Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI-Fermentas)

---

Der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* ist ein Mix aus sieben verschiedenen Proteinen und dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Zur Visualisierung der einzelnen Markerbanden kann im Anschluss beispielsweise eine Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau durchgeführt werden. Im Folgenden sind die einzelnen Proteine mit ihrem relativen Molekulargewicht in Dalton (Da) aufgeführt:

116.000 - Beta-Galactosidase (*E. coli*) | 66.200 - Albumin (Rinderserum) | 45.000 - Ovalbumin (Hühnereiweiß) | 35.000 - Lactat-Dehydrogenase (Schweinemuskel) | 25.000 - RE Bsp98I (*E. coli*) | 18.400 - Beta-Lactoglobulin (Kuhmilch) | 14.400 - Lysozym (Hühnereiweiß)

---

### 2.3.2.2 PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI-Fermentas)

---

Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* besteht aus zehn rekombinanten Proteinen, die gereinigt und gefärbt wurden. Dieser Marker wird bei Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem *Western Blot* eingesetzt. Nachfolgend sind die relativen Molekulargewichte in Da der einzelnen Fragmente aufgeführt:

170.000 | 130.000 | 95.000 | 72.000 | 55.000 | 43.000 | 34.000 | 26.000 | 17.000 | 10.000

---

### 2.3.2.3 Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

---

Dieser Protein-Marker besteht aus acht verschiedenen, rekombinant hergestellten Proteinen, welche kovalent an einen blauen Farbstoff gekoppelt wurden. Für eine ausgeglichene Intensität der einzelnen Banden im Gel, wurden die Konzentrationen entsprechend angeglichen. Die enthaltenen Proteine und ihr relatives Molekulargewicht in Da sind nachfolgend aufgeführt:

175.000 – MBP-β-Galactosidase (*E. coli*) | 80.000 - MBP-Paramyosin (*E. coli*) | 58.000 – MBP-CBD (*E. coli*) | 46.000 – CBD-*Mxe* Intein-2CBD (*E. coli*) | 30.000 – CBD-*Mxe* Intein (*E. coli*) | 25.000 – CBD-BmFKBP13 (*E. coli*) | 17.000 – Lysozym (Hühnereiweiß) | 7.000 – Aprotinin (Rinderlunge)

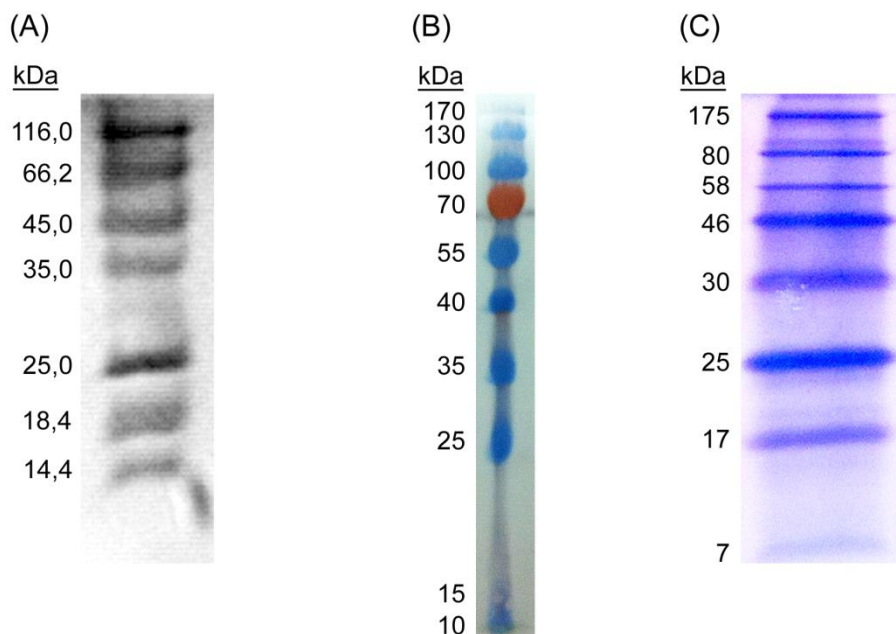


Abbildung 10: Verwendete Protein-Marker: (A) *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (2.3.2.1), (B) *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (2.3.2.2) (C) *Prestained Protein Marker, Broad Range* (2.3.2.3).

## 2.4 Oligodesoxyribonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA synthetisiert. Zur Generierung der Stammlösungen wurden die entsalzten und entkoppelten Oligonukleotide mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt.

Tabelle 3: Liste der während dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Nukleinsäuren.

Oligodesoxyribonukleotid	Sequenz (5' → 3')
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
LVHH-PCR1_up	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
LVHH-PCR1_lo	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
LVHH-PCR2_up	CCCAGCCGGCCATGGCTGAKGTBCAGCTGGTGGAGTCTGG
LVHH-PCR2_lo	GCCGCTGAGGAGACGGTGACCWGGGT
LVHH-PCR3_up	GGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTG-AKGTBCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG
LVHH-PCR3_lo	ATAAGCTTTTGTTCGGATCCGGCCCCGAGGCCGCGCTG-GAGACGGTGACCWGGGTCC
LVHH-pCT-PCR2_UP	GTGGTGGTGGTTCTGCTAGCATGGCTG-AKGTBCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG

LVHH-pCT-PCR2_LO	ATAAGCTTTTGTTCGGATCCGCTGGAGACGGTGACCWGGGTCC
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
Oligo-(dT) <sub>20</sub> ( <i>Superscript III</i> )	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
pAK200SequenceOligo_up	TGACCATGATTACGAATTTCTAGATAACGA
pAK200SequenceOligo_lo	TAGCGTTTGCCATCTTTTCATAATCAAAAT
pCadVHH_EK2_pMX_up	GCGCGCGGTACCCGGCCGGGGCTCCATGGCTGAT- GTGCAGCTGCAGGCGT
pCadVHH_EK2_pMX_lo	GCGCGCGGATCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGTCCCT
pCadVHH_EK4_pMX_up	GCGCGCGGTACCCGGCCGGGGCTCCATGGCT- GAGGTCCAGCTGCAGGCGT
pCadVHH_EK4_pMX_lo	GCGCGCGGATCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGTCCCC
pCadEK4_to_pYDKCoil_up	CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGG- TACAACTCGATAAAAGA ATGGCTGAGGTCCAGCTGCAGGCGTCCG- GA
pCadEK4_to_pYDKCoil_lo	GGCCAGGGGACCCAGGTCAC- CGTCTCCAGCGGGGGCGGGTCTGCGAAAACCTGTACTT- CCAGTCCCCTCCAACGCCCC
pCT-lib-fwd (up)	GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTT- CTGCTAGC
pCT-lib-rev (lo)	ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCG- GATCC
pEX_LVHH_SfiI_NheI_up	GCGCGCGGCCAGCCGGCCGGTTCTGCTAGCATGGCTGA
pEX_LVHH_SfiI_BamHI_lo	GCGCGCGGCCCCGAGGCCCGGATCCGCTGGAGACGGTGACC
pEX_pCadVHH_repair_G22 6A_up	TCTCCAGAGACAACACCAAGAACACACTGT
pEX_pCadVHH_repair_G22 6A_lo	ACAGTGTGTTCTTGGTGTGTCTCTGGAGA
pMX_Sequence_Oligo_+40_ up	GCCAGCGGTCGTCAGACTGT
pTET_Sequence-40_lo	GGTTTTCAGAACAGGCATT
pYD-CysTEVECoil_PCR1_up	GGGGGCGGGTCTGCGAAAACCTGTACTTCCAGTCCGCCGCTT- CTGGCCCCGGGGA
pYD-CysTEVECoil_PCR1_lo	ATGGTGATGCTTTCCAAGACGATTCATTTTCGATGTCTGTG- TAGCCCCCTTCTCCAGAGCGC

pYD-CysTEVECoil_PCR1_up	GGGGGCGGGTCCTGCGAAAACCTGTACTTCCAGTCCGCCGCTT- CTGGCCCCGGGGA
pYD-CysTEVECoil_PCR2_up	TAAAGTTTGTCTCAGGAAGTAGAAAAAGTTGCTCTT- GCGGCCAAGCTTGGGGGCGGGTCCTGCGAAAA
pYD-CysTEVECoil_PCR2_lo	CATCTACACTGTTGTTATCAGATCAGCGGGTTTAAACTCAATGGT- GATGGTGATGGTGATGCTTTCCAAGAC
pYD-GSlang_CysTEVECoil_PCR2_up	TAAAGTTTGTCTCAGGAAGTAGAAAAAGTTGCTCTT- GCGGCCAAGCTTG- GAGGCGGTGGCTCCGGGGGCGGGTCCTGCGAAAA
pYD-huFC_CysTEVKCoil_PCR1_up	GGGGGCGGGTCCTGCGAAAACCTGTACTT- CCAGTCCCCCTCCAACGCCCCCTGGGAA
pYD-huFC_CysTEVKCoil_PCR1_lo	TGATGGTGATGGAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGT- CGCCCCCTCTTTGAGGGCGC
pYD-huFC_CysTEVKCoil_PCR2_up	TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGG- TAAAGGGGGCGGGTCCTGCGAAAA
pYD-sequence-oligo_up	ACAAATACTACTATTGCCAG
pYD-sequence-oligo lo	GAACAAAGTCGATTTTGTTA
pYD_app8_-40_Sequence-extreme_up	AAAGTATCAACAAAAAATTG
pYD_pCadherinVHH 4A_up	CATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTACAACTCGATAAAAGAAT- GGCTGAGGTCCAGCTGCAGGCGTCCGGA
pYD_pCadherinVHH 4A_loNEU	GGGGACACGTGTGGGTCTTGTCACTTGATTTTGGGTAAACGCTG- GAGACGGTGACCTGGGTCCCCTGGCC
<i>Random Hexamer (Super-scriptIII)</i>	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
VHH_Yeast2pEX_QPAMA up	GCGCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTGAGGTCCAGCTGCAGGCGTC
VHH_Yeast2pEX_QPAMA_lo	GCGCGCGGCCCCGAGGCCCGCTGGAGACGGTGACC

## 2.5 Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide beschrieben. Die aufgeführten Genkarten enthalten alle wichtigen genetischen Elemente, die durch Pfeile in ihrer funktionellen Orientierung dargestellt sind.

### 2.5.1 pAKds200dsba-MT

Das Plasmid pAKdsVHH-MT ist ein Derivat des Plasmids pAK200<sup>[176]</sup> und dient als *phagemid* der Amplifikation von Phagen-Partikeln in *E. coli*. Induktion der Expressionskassette führt zu einer *in-frame* Fusion aus einem N-terminalen VHH-Fragment und einem C-terminalen pIII-Hüllprotein. Dazwischen befinden sich ein Myc-Epitop und eine TEV-Protease Spaltstelle.

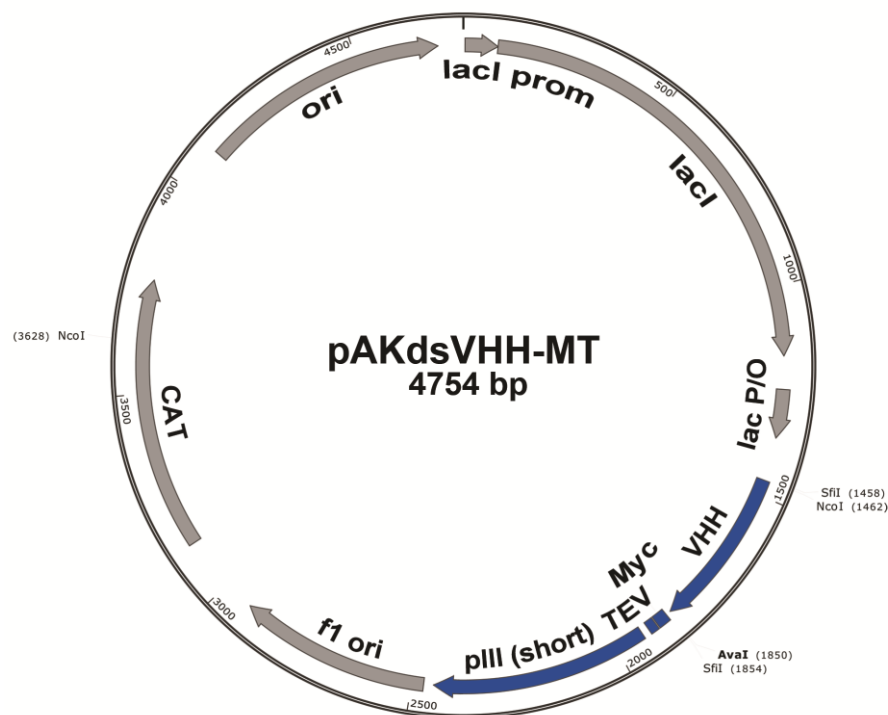


Abbildung 11: Vektorkarte von pAKdsVHH-MT. lacI Prom – Promotor-Region des lacI-Gens; lacI – Gen des *Escherichia coli* Lac-Repressors für das LacI-Protein; lac P/O – Promotor/Operator-Region des Lactose-Operons; VHH – variable domain of the heavy chain of a heavy chain antibody (VHH) aus *Lama glama*; Myc – Myc-Tag Epitop; TEV – genetische Sequenz der TEV-Protease aus dem *Tobacco Etch Virus* (ENLYFQ/G); pIII(short) – codierende Sequenz des Hüllproteins pIII des Bakteriophagen M13; f1 ori – Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; CAT – Gen der Chloramphenicol Acetyltransferase (CmR); p15A ori – Replikationsursprung P15A.

### 2.5.2 pCT-VHH

Das Plasmid pCT-VHH ist ein Derivat des Plasmids pCT von K. Dane Wittrup<sup>[127]</sup>. Es dient der Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der Vektor pCT ist ein binärer Vektor und dient der Transformation sowohl von Hefen als auch von *E. coli*.

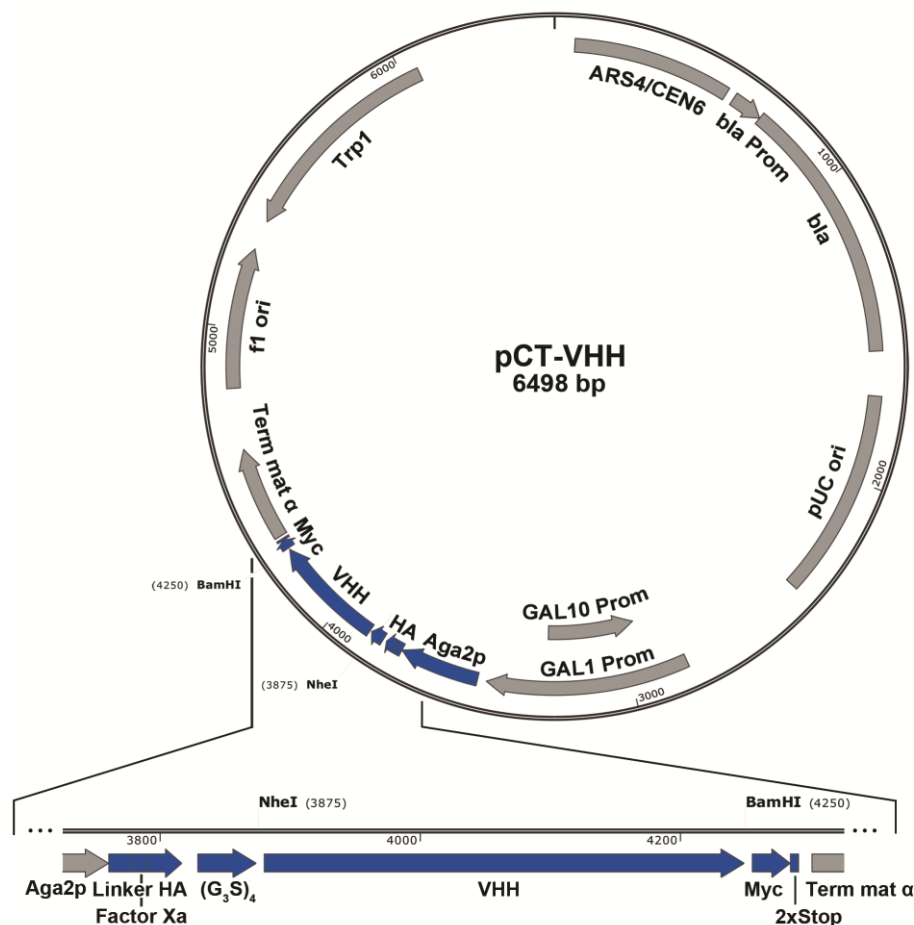


Abbildung 12: Vektorkarte von pCT-VHH. ARS4/CEN6 – low-copy Replikationsursprung für die Amplifikation in Hefen; bla Prom – Promotor-Region für das  $\beta$ -Lactamase-Gen; bla – codierende Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase (AmpR); pUC ori – Replikationsursprung pUC für die Amplifikation in *E. coli*; GAL 1 / GAL 10 – DNA-Bindungsstelle für den GAL 1 bzw. GAL 10 Transkriptionsfaktor; Aga2p – codiert für das  $\alpha$ -Agglutinin Protein Aga2p; Linker – kurze Linker-Sequenz; Faktor Xa – Sequenz für die Spaltstelle der Prothrombinase Faktor Xa; HA – Gen für das Hämagglutinin-Epitop; (G3S)<sub>4</sub> – Sequenz für einen vierfach Glycin-Serin-Linker; VHH – *variable chain of a heavy chain of a heavy-chain antibody*; Myc – Sequenz für das Myc-Epitop; 2xStop – 2 Stopcodons; Term mat  $\alpha$  – Terminatorsequenz Mat  $\alpha$ ; f1 ori – Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; Trp1 – Tryptophan-Gensequenz.

### 2.5.3 pEXpelB-VHH

Das Plasmid pEX ist ein Vektorkonstrukt zur periplasmatischen Proteinexpression in *E. coli*. Hierfür steht eine pelB-Signalsequenz hinter einem lac-Promotor zur Verfügung.

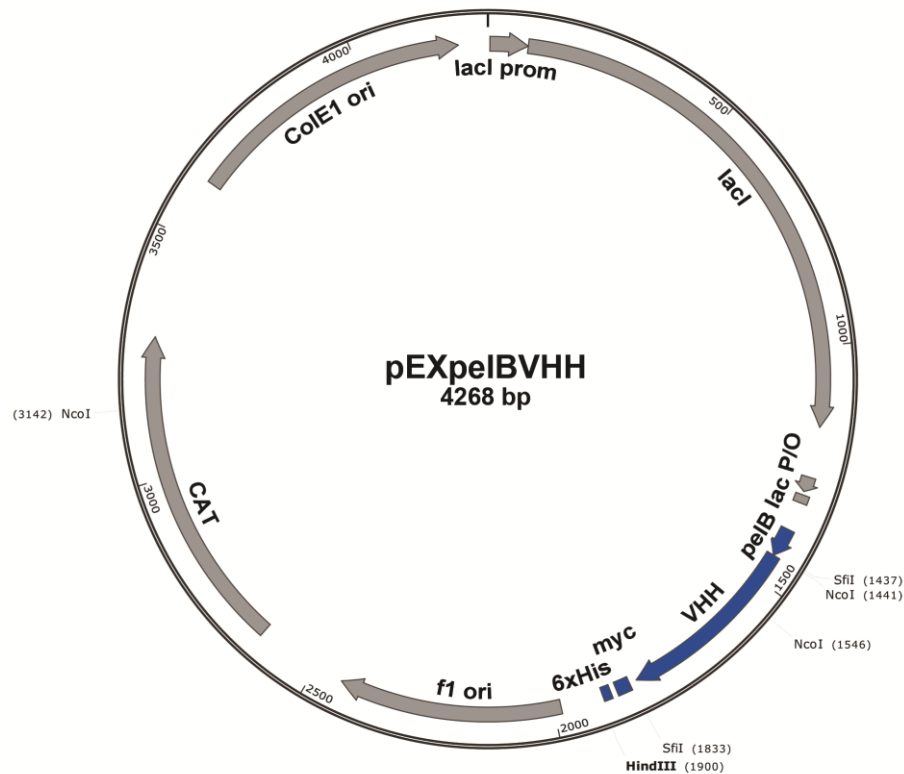


Abbildung 13: Vektorkarte von pEXpelB-VHH. lacI Prom – Promotor-Region des lacI-Gens; lacI – Gen des *Escherichia coli* Lac-Repressors für das LacI-Protein; lac P/O – Promo-tor/Operator-Region des Lactose-Operons; pelB – Sequenz des Signalpeptids pelB zur Periplasmatranslokation; VHH – *variable chain of a heavy chain of a heavy-chain antibody*; Myc – Gensequenz des Myc-Epitops; 6xHis – Sequenz des Hexahistidin-Tags; f1 ori – Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; CAT – codierende Sequenz für die Chloramphenicol Acetyltransferase (CmR); ColE1 ori – Replikationsursprung des Plasmids colE1.



### 2.5.4 pTETpelB-VHH-AP

Das Plasmid pTETpelB-VHH-AP erlaubt die Produktion eines Proteins als N-terminale Fusion mit einer Alkalischen Phosphatase. Für die Reinigung ist C-terminal ein Hexahistidin-Tag codiert.

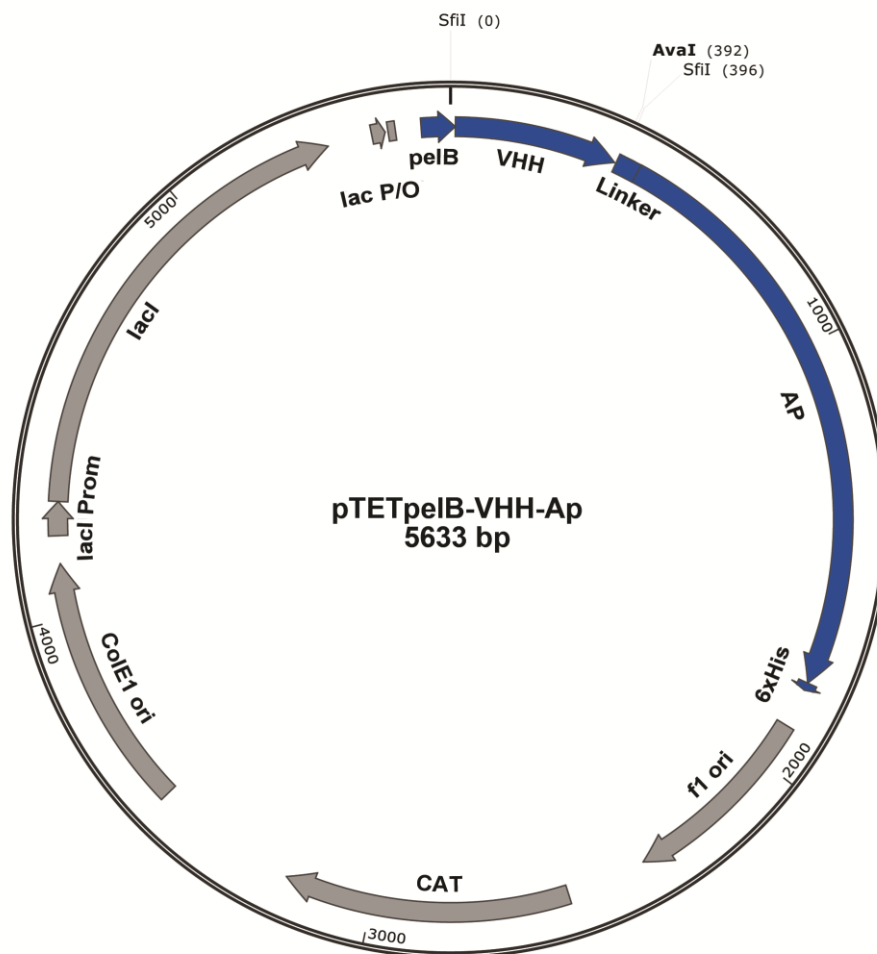


Abbildung 14: Vektor pTETpelB-VHH-AP. lac P/O – Promotor/Operator-Region des Lactose-Operons; pelB – Sequenz des Signalpeptids pelB zur Periplasmatranslokation; VHH – variable chain of a heavy-chain antibody (VHH); Linker – kurze Linker-Sequenz; AP – genetische Sequenz für eine Alkalische Phosphatase; 6xHis – Gensequenz für ein Hexahistidin-Tag; f1 ori – Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; CAT – Gen für die Chloramphenicol Acetyltransferase (CmR); ColE1 ori – Replikationsursprung des Plasmids colE1; lacI Prom – Promotor-Region des lacI-Gens; lacI – Gen des *Escherichia coli* Lac-Repressors für das LacI-Protein.

### 2.5.5 pYDapp8-VHH-huFC

Das Plasmid pYDapp8-VHH-huFC ist ein Derivat des Plasmids pYDapp8-VHHD12-huFC von Laura Riehl (Merck Serono, Darmstadt). Dieser Vektor dient der löslichen Expression eines Proteins (hier VHH-Fragmente) durch *S. cerevisiae* als N-terminale Fc-Fusion. Für eine effiziente Sekretion in das umgebende Medium dient das Signalpeptid app8<sup>[177]</sup>.

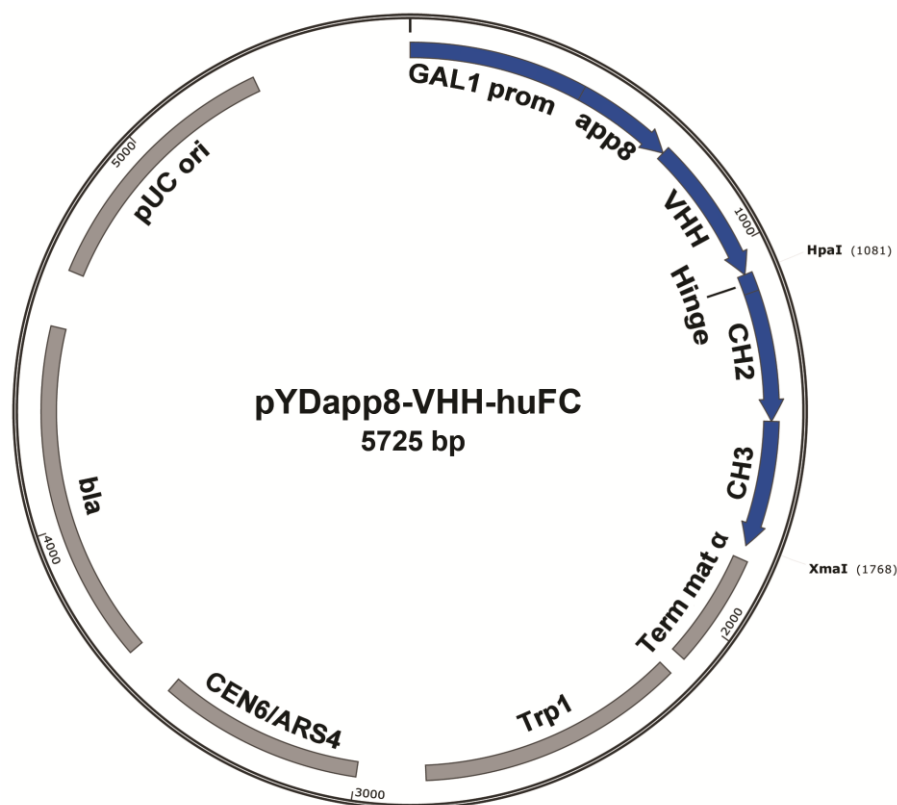


Abbildung 15: pYDapp8-VHH-huFC. GAL1 Prom – DNA-Bindungsstelle für den GAL1-Transkriptionsfaktor; app8 – Sequenz für das Signalpeptid app8; VHH – variable chain of a heavy chain of a heavy-chain antibody (VHH); Hinge – hinge Region der schweren Kette; CH2 – konstante Domäne 2 der schweren Gamma-Kette; CH3 – konstante Domäne 3 der schweren Gamma-Kette; Term mat α – Terminatorsequenz Mat α; Trp1 – Tryptophan-Gensequenz; CEN6/ARS4 – low-copy Replikationsursprung für die Amplifikation in Hefen; bla – codierende Sequenz für die β-Lactamase (AmpR); pUC ori – Replikationsursprung pUC für die Amplifikation in *E. coli*.

## 2.6 Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Enzyme und sonstigen Proteine. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Produkt	Hersteller
Anti-E-Epitop-Antikörper	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Maus-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Ziege, IgG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Anti-Maus-Biotin-Konjugat (Ziege, IgG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Anti-Maus-FITC-IgG (Ziege, IgG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Anti-Myc-Epitop-Antikörper (Maus, IgG)	AK Friedl, TU Darmstadt
Anti-Myc-Epitop-Antikörper (Maus, IgG)	Abcam plc, Cambridge UK
Humanes C4bp-Bindeprotein	Thomas Hofmeyer (AK Kolmar, TU Darmstadt)
CD276 (B7-H3)	R&D Systems Europe Ltd., Abington, UK
DNA Polymerase, Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
DNA Polymerase, Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity	Finnzymes / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
DNA Polymerase, Taq	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
DNA Polymerase, Taq	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA Polymerase, Taq (Haus-Taq)	AK Kolmar, TU Darmstadt
EGFR (human)	Merck KGaA, Darmstadt
EGFR (murin)	Merck KGaA, Darmstadt
EphA2	R&D Systems Europe Ltd., Abington, UK
Erbitux <sup>®</sup> (Cetuximab)	Merck KGaA, Darmstadt
Gamunex	Bayer Pharma AG, Leverkusen
Meerrettich-Peroxidase Typ VI-A	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
P-Cadherin (human)	R&D Systems Europe Ltd., Abington, UK
Penta-His-AlexaFluor488 Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
Phusion <sup>®</sup> RT-PCR Kit	Finnzymes / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien / New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Reverse Transkriptase, M-MuLV (RNase H-)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Reverse Transkriptase, SuperScript® III	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Reverse Transkriptase, M-MuLV pegGOLD	PegLab Biotechnologie GmbH, Erlangen.
Saglin	AK Kolmar, TU Darmstadt
Saglin-Thioredoxin	AK Kolmar, TU Darmstadt
Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (SAPE)	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot / Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

## 2.7 Chemikalien

Tabelle 5: Liste der während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicilin (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Anhydrotetracyclinhydrochlorid	ACROS Organics, New Jersey
Brillantblau R250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

<i>Casamino acids</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Chelating Sepharose™ Fast Flow</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chlornaphtol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Biomol GmbH, Hamburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Ethylenglycol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Freunds Adjuvans, komplettes	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Freunds Adjuvans, inkomplettes	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
D-Galaktose	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kälber Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchloridtetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumborat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Nickelchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Paraffinöl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Polyethylenglycol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TEMED	Serva Chemikalien GmbH
Tetracyclin Hydrochlorid	Applichem GmbH, Darmstadt
TRI Reagent BD <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Tris-Acetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TWEEN 20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base w/o NH <sub>4</sub> Ac	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zinksulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Sulfo-NHS-LC Biotin	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien

## 2.8 Sonstige Materialien und Geräte

Tabelle 6: Liste der während dieser Arbeit verwendeten sonstigen Materialien und Geräte. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät / Produkt	Hersteller
AF 100 (Eismaschine)	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Autoklav, HAST-4-5-6	Zirbus, Bad Grund/Harz
Autoklav, V-150	Systec, Wettengel
Autoklav, Varioklav	Thermo Electron, München
Basic Meter (pH-Meter)	Sartorius, Göttingen
BD Accuri C6 flow cytometer (Sampler)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Influx™ (FACS)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biologische Sicherheitswerkbank LaminAir HLB 2460 BS, Klasse II	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioSpec-nano	Shimadzu, Weiterstadt
Brutschrank	Heraeus, Hamburg
Brutschrank Incucell	MMM Med Center Einrichtungen GmbH
CASY® TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Cell Disruptor	Constant Systems Limited, Daventry Northants, UK
Certomat® BS-1 (Inkubationsschüttler)	Sartorius, Göttingen
Dynabeads® Streptavidin Trial Kit	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Economic Freezer (Gefrierschrank)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
<i>EPICS Alignment Fluorespheres for optical alignment of flow cytometers (fluoreszierende MicroBeads)</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elisareader, GENios™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Filtereinheiten Millex FG13	Millipor, Eschborn

Feinwaage, Sartorius UniversalU4800P	Sartorius, Göttingen
Filter Papier, 3 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
<i>French Pressure Cell Press</i> , SLM AMINCO	SLM Instruments, Inc.
Geldokumentationskammer	Olaf Waase, Groß Schneen
Gel-Dokumentationssystem, Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Gelgießkammer, Multiple Gel Caster	Hoefer, San Francisco
<i>Gene Pulser<sup>®</sup></i> und <i>Gene Pulser Xcell<sup>™</sup> PC Modul Pulse Controller</i>	BioRad, München
Glaswaren	Schott, Mainz
GS Junior System (454 Sequencing)	454 Life Sciences (Roche), Branford, USA
Herafreezer, -80 °C Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
HisTrap <sup>™</sup> HP-Säule	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HiTrap <sup>™</sup> Protein A Säule (1 ml)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Hoefer <sup>™</sup> DualGel Caster	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Homogenisator <i>Sonopuls HD 2070</i>	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin
<i>Homogenizer</i>	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
IMAC-Säulen	Qiagen GmbH, Hilden
Kühlschrank, LKPV 6522 Profiline	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer IKAMAG RCT, beheizbar	IKA-Labortechnik, Staufen
Mastercycler <sup>®</sup> Standard	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette, 200 µl	Eppendorf, Hamburg
MicroBeads	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mikroliter-Pipetten, 1000 µl, 200 µl, 20 µl	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop, Agilent iMIC	TILL Photonics, Agilent Technologies, Gräf- ling
Mikroskop Axioskop mit Durchlicht, Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 16x, Objektive: Plan Neofluar 40x/0,65 Oil, Plan Neofluar 100x/1,25 Oil, 440460, Acroplan 4x/0,1, Plan 100x/1,25 Oil	Zeiss, Oberkochen



96er Mikrotiterplatten, diverse	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Mikrowelle, Microstar MD6459	MTC-Medion, Mühlheim
MoFlo <sup>®</sup> Zytometer mit <i>Cyclone</i> Sortiereinheit, <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> (FACS) mit <i>Enterprise II Laser</i> , Summit <sup>®</sup> v4.0 & v4.3 Software-Paket	Dako Cytomation, Fort Collins, USA
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Novoblot (Elektrophorese Apparatur), 2117-250	Pharmacia/LKB, Freiburg
Nitrozellulose Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Objektträger (26x76 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Octet RED, FortéBio	FortéBio Pall Corp., USA
Optima <sup>™</sup> LE-80K Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Parafilm <sup>®</sup> "M" Laboratory Film	American National Can., Chicago, USA
Papiertücher <i>Kimwipes</i> <sup>®</sup> , fusselfrei	Kimberley-Clark, USA
<i>PAXgene</i> <sup>®</sup> <i>Blood RNA tubes</i>	Preanalytix, Heidelberg
PD10-Desalting Säule	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Petrischalen, 92x16 mm und 150x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Gefäße, <i>Multiply</i> <sup>®</sup> - $\mu$ Strip 8er-Kette	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Maschine, <i>Mastercycler Standard</i>	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine, <i>MyCycler</i> <sup>™</sup>	BioRad, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe, Pipetus <sup>®</sup> -Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten (0,5 ml, 1 cm Schichtdicke)	Hellma, Mühlheim/Baden
<i>Quick Seal</i> <sup>™</sup> <i>Centrifuge Tubes</i> (25x89 mm)	Brady GmbH, Egelsbach
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 2 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Sterilbank, Enviroco	CEAG Schirp Reinraumtechnik, Essen
Schüttler, Lab-Shaker	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
Tischzentrifuge, Mikroliter	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Taumelschüttler, Polymax 2040	Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelkheim
Thermoblock	Olaf Waase, Groß Schneen

Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Schwenkbecherrotor SW41TI	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
UV-Küvetten, Halb-Mikro 10 mm Lichtweg	Sarstedt AG, Nümbrecht
UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch	Herolab, Wiesloch
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	Millipor, Eschborn
Vertikalrotor VTi-50	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Vortex <sup>®</sup> Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage, PM 4600	Mettler-Waagen GmbH, Gießen
Waage, Universal	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage, MilliQ-Synthesis A10	Millipor, Billerica, MA, USA
Zellu Trans Dialysemembran, diverse	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zentrifuge, Sigma 3K30 Kühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Zentrifuge, Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Sigma 6K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Zweistrahlspektrophotometer UV-1650-PC mit UVProbe v 2.20 Software Paket	Shimadzu, Weiterstadt

## 2.9 Nährmedien

### 2.9.1 Zur Verwendung mit *Escherichia coli*

#### dYT-Medium

Chemikalie	Anteil
Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
Trypton	1,6 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

**LB-Medium**

Chemikalie	Anteil
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	1 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

**SOC-Medium**

Chemikalie	Anteil
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	1 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Für die Herstellung fester Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren die entsprechenden Antibiotika aus den jeweiligen 1.000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml Chloramphenicol, 100 µg/ml Ampicillin 12,5 µg/ml Tetracyclin bzw. 75 µg/ml Kanamycin zugegeben. Mengenangaben der Induktionsmittel wie IPTG sowie Färbelösungen wie Nilrot sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

**2.9.2 Zur Verwendung mit *Saccharomyces cerevisiae*****YPD-Medium**

Chemikalie	Anteil
Dextrose	2 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Hefe-Extrakt	1 % (w/v)

Zur Sterilisation wurde YPD-Medium für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Anschließend konnte das Medium für mehrere Wochen bei RT gelagert werden.

### SD(-Trp)-Medium (SDCAA)

	Chemikalie	Masse
Phosphate	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,4 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	8,56 g
	In 900 ml destilliertem Wasser lösen und autoklavieren.	
Supplement	Glukose	20 g
	Yeast Nitrogen Base w/o NH <sub>4</sub> Ac	1,7 g
	Ammoniumacetat	5 g
	Bacto casamino acid	5 g
	In 100 ml destilliertem Wasser lösen, Ampicilin/Streptomycin (Endkonzentration = 100 µg/ml bzw. 1.000 µg/ml) zugeben und mittels Sterilfilter den autoklavierten Phosphaten zuführen.	

### SG-Medium (SGCAA)

	Chemikalie	Masse
Phosphate	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,4 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	8,56 g
	In 900 ml destilliertem Wasser lösen und autoklavieren.	
Supplement	Galaktose	20 g
	Yeast Nitrogen Base w/o NH <sub>4</sub> Ac	1,7 g
	Ammoniumacetat	5 g
	Bacto casamino acid	5 g

In 100 ml destilliertem Wasser lösen, Ampicilin/Streptomycin (Endkonzentration = 100 µg/ml bzw. 1.000 µg/ml) zugeben und mittels Sterilfilter den autoklavierten Phosphaten zuführen.

### Low-Dextrose SD(-Trp)-Medium (Low-SDCAA)

	Chemikalie	Masse
Phosphate	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,4 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	8,56 g
	In 900 ml destilliertem Wasser lösen und autoklavieren.	
Supplement	Galaktose	5 g
	Yeast Nitrogen Base w/o NH <sub>4</sub> Ac	1,7 g
	Ammoniumacetat	5 g
	Bacto casamino acid	5 g
	In 100 ml destilliertem Wasser lösen, Ampicilin/Streptomycin (Endkonzentration = 100 µg/ml bzw. 1.000 µg/ml) zugeben und mittels Sterilfilter den autoklavierten Phosphaten zuführen.	

SD- und SG-Medien wurden bei Bedarf für einige Wochen bei 4-8 °C gelagert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde den Phosphaten vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

## 2.10 Lösungen und Puffer

Die nachfolgenden Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders beschrieben, in Aqua bidest angesetzt.

Tabelle 7: Liste der während dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Chemikalie	Menge
<b>Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer</b>	
Tris-HCl	100 mM, pH=9,0
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
<b>Ammoniumacetat-Stammlösung</b>	
NH <sub>4</sub> Ac	7 M
<b>Ampicillin-Stammlösung</b>	
Ampicillin (Na-Salz)	100 mg/l
sterilfiltriert	
<b>APS-Stammlösung</b>	
APS	10 % (w/v)
Aufbewahrung bei -20 °C	
<b>BCIP-Lösung</b>	
BCIP	50 mg/ml
In Dimethylformamid	70 % (v/v)

**Block-Lösung**

BSA 3 % (w/v)

In 1x PBS

**Cäsiumchlorid-Gradient-Lösungen:****Lysozym-Lösung**

Lysozym 10 mg/ml

Tris pH8,0 10 mM

**Lösung C-I**

Glucose 50 mM

Tris pH8,0 25 mM

EDTA 10 mM

**Lösung C-II**

NaOH 0,2 N

SDS 1 % (w/v)

**Lösung C-III**

Kaliumacetat 5 M

Eisessig 75,5 ml

Aqua bidest add 500 ml

**Chloramphenicol-Stammlösung**

Chloramphenicol 25 mg/ml

In 96 % Ethanol

**Chlornaphtol-Stammlösung**

Chlornaphtol 168 mM

In Methanol

**Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE****Lösung A**

Coomassie R-250 0,2 % (w/v)

In Methanol

**Lösung B**

Essigsäure 20 % (w/v)

Lösung A und Lösung B kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 mischen.

**dNTP-Lösung**

dATP 12,5 mM

dCTP 12,5 mM

dGTP 12,5 mM

dTTP 12,5 mM

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

Ethidiumbromid 10 mg/ml

**Elektrodenpuffer (10x Laemmli-Laufpuffer)**

Tris-Base 250 mM

Glycin 2 M

SDS 0,1 % (w/v)



**Elektroporations Puffer** <sup>[178]</sup>

Sorbitol	1 M
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

***freezing solution*** <sup>[147]</sup>

Glycerol	2 % (v/v)
Yeast Nitrogen Base w/o NH <sub>4</sub> Ac	0,17 % (w/v)
Ammoniumacetat	0,5 % (w/v)

**Formamidfarbmarker**

SDS	0,05 % (w/v)
EDTA	0,1 mM
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)
D-Saccharose	Gesättigt
In Formamid	

**Galaktose-Stammlösung**

D-Galaktose	1 M
In 1x PBS	

**Gel-Puffer** <sup>[179]</sup>

Sammelgel-Puffer:

Tris-HCl	1,25 M, pH=6,8
----------	----------------

Trenngel-Puffer:

Tris-HCl	1,875 M, pH=8,0
----------	-----------------

**HOECHST-Puffer  
(Harnstoff-Proteinprobenpuffer)**

Harnstoff	8 M
Tris-Base	200 mM
DTT	200 mM
SDS	2 % (w/v)

**Imidazol-Puffer**

Imidazol-HCl	1 M, pH=7,8
--------------	-------------

**IPTG-Stammlösung**

IPTG	1 M
Sterilfiltrieren und lagern bei -20 °C	

**Kanamycin-Stammlösung**

Kanamycin	75 mg/l
Sterilfiltriert	

**Litiumacetat-Puffer<sup>[178]</sup>**

LiAc	0,1 M
DTT	10 mM

**Lysozym-Stammlösung**

Lysozym	10 mg/ml
---------	----------

**Meerrettichperoxidase-Stammlösung**

Peroxidase	0,375 U/ml
In 1x PBS	
Lagerung bei -20 °C	

**NBT-Stammlösung**

NBT	75 mg/ml
In Dimethylformamid	70 % (w/v)

**Nilrot-Färbelösung**

Nilrot	2 mg/ml
In DMSO	

**PBS Tween-Puffer**

NaCl	140 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
Tween 20	0,05% (v/v)

***Phosphat buffered saline (PBS)***

NaCl	140 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

**Phenol/Chloroform**

Phenol/TE	1 Vol
Chloroform	1 Vol

**Ponceau S-Färbelösung**

Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (w/v)

Ponceau S	0,3 % (w/v)
<b>Puffer E1</b> <sup>[147]</sup>	
Tris (pH=7,5)	10 mM
Sucrose	270 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
<b>Reaktionspuffer für Reaktionsendonukleasen</b> (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	
<b>Blau</b>	
Tris-HCl	10 mM, pH=7,5
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
<b>Gelb</b>	
Tris-Acetat	33 mM, pH=7,9
Magnesiumacetat	10 mM
Kaliumacetat	66 mM
<b>Grün</b>	
Tris-HCl	10 mM, pH=7,5
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	50 mM
<b>Orange</b>	
Tris-HCl	50 mM, pH=7,5
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	100 mM
<b>SDS-Stammlösung (10%)</b>	
SDS	10 % (w/v)

**Sucrosefarbmarker  
(für DNA-Gelelektrophorese)**

D-Saccharose	60 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,1 % (w/v)
In Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	

**T4-DNA-Ligase-Puffer**

ATP	5 mM
DTT	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
Tris-HCL	400 mM, pH=7,8 bei 25 °C

**Taq Puffer mit KCl (10x / MBI Fermentas  
GmbH, St. Leon-Rot, St. Leon-Rot)**

KCl	500 mM
Nonidet P40	0,8 % (v/v)
Tris-HCl	100 mM, pH=8,8 bei 25 °C

**Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) (50x)**

Tris-Acetat	2 M
EDTA	50 mM

**Tris-DTT Puffer**

1,4-Dithiothreitol	390 g/l
Tris	121,1 g/l
Aqua bidest	Add 1.000 ml, pH=8,0

<b>Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)</b>	
Tris-Base	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
<b>Tetracyclin-Stammlösung</b>	
Tetracyclin	12,5 mg/l
In 96 % Ethanol	
<b>Western-Blot Transferpuffer</b>	
Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

## 2.11 Kits

Tabelle 8: Liste der für diese Arbeit verwendeten *Kits*. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Produktname	Hersteller
<i>CloneJET PCR cloning kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
<i>PAXgene blood miRNA Kit</i>	Preanalytix, Heidelberg
<i>Phusion RT-PCR Kit</i>	Biozym, Finnzymes
<i>PureLink™ RNA Mini Kit</i>	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
<i>QIAamp® RNA blood Mini Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>SuperScript® III Reverse Transkriptase</i>	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
<i>Topo® TA Cloning® Kit</i>	Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA

Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation
Wizard <sup>®</sup> Plus SV Midipreps DNA Purification System	Promega Corporation
Wizard <sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega Corporation

## 2.12 Software zur Datenverarbeitung

Tabelle 9: Liste der für diese Arbeiten verwendeten Software- und Datenverarbeitungspakete. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Software	Hersteller
ApE – A Plasmid Editor	M. Wayne Davis, Department of Biology, Utah, USA
BioEdit v7.0.7	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
Excel	Microsoft, Redmond, USA
fortéBIO Data Analysis 6.3 und 7.0	fortéBIO, Menlo Park, USA
fortéBIO Data Aquisition 6.3 und 7.0	fortéBIO, Menlo Park, USA
GS Junior System Software Package v2.7	454 Life Sciences (Roche), Branford, USA
Jalview (v2)	Waterhouse, Barton <i>et al.</i> (2009) <sup>[180]</sup>
Jemboss (v1.5)	Carver und Bleasby (2003) <sup>[181]</sup>
Mendeley Desktop v1.12.1	Mendeley Ltd., London, UK
Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporate, San Jose, USA
PyMol <sup>™</sup> v0.99	DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA
GS Junior System Software Package v2.7	Roche AG, Basel, Schweiz
<i>SigmaPlot 2002 v8.02, Software für wissenschaftliche EDV</i>	SPSS Inc., Chicago, USA
Summit <sup>®</sup> v4.0 & v4.3	Beckman Coulter, Inc., USA
Word	Microsoft, Redmond, USA





### 3 Methoden

#### 3.1 Handhabung von Bakterien

##### 3.1.1 Lagerung von *Escherichia coli*

Die verwendeten *Escherichia coli* Stämme wurden zur längeren Aufbewahrung mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert. Von regelmäßig verwendeten Bakterienstämmen wurden Kulturen auf M9-Minimal-Agarplatten, bei häufigem Gebrauch auf dYT-Agarplatten angelegt. Die Kulturen wurden hierfür auf den entsprechenden Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C kultiviert und anschließend bei 4 °C für einige Wochen gelagert.

##### 3.1.2 Vermehrung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Alle verwendeten *Escherichia coli* Stämme wurden bei 37 °C und 200 U/min in dYT-Medium kultiviert und vermehrt. Zur Selektion durch die Plasmid vermittelten Antibiotika-Resistenzen, wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika beigegeben. Volumina von bis zu 5 ml wurden in Kulturröhrchen, Volumina ab 50 ml in Kolben unter Schütteln bei etwa 200 U/min im Inkubationsschüttelschrank (Certomat<sup>®</sup> BS-1, Sartorius) kultiviert.

##### 3.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte von Kulturen wurde die optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Spektralphotometer (Bio Photometer, Eppendorf) gemessen. Für die Bestimmung des Leerwerts wurde zuvor die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) des unbeimpften Mediums gemessen. Bei einer gemessenen  $OD_{600}$  von größer 1 wurden entsprechende Verdünnungen angesetzt und die tatsächliche optische Dichte errechnet.

##### 3.1.4 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation

Transformationen von *Escherichia coli* wurden standardmäßig nach der Elektroporationsmethode (Dower *et al.*, 1988) durchgeführt. Die Transformation wurde zur Vermehrung von Plasmiden und zur Replikation von ligierten Plasmiden eingesetzt. Die benötigten elektrokompetenten Zellen wurden wie nachfolgend beschrieben generiert:

50 ml dYT-Medium wurden mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm inokuliert und bei 37 °C und 200 U/min bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde anschließend bei 4.000 U/min und 4 °C für 15 min pelletiert (Mutifuge 3L-R, Heraeus) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend dreimal mit eiskaltem Aqua bidest (50 ml, 50 ml, 10 ml) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand ebenfalls verworfen

und das Pellet in etwa 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem Aqua bidest aufgenommen. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gelagert. Zur Retransformation mit Plasmiden wurden 100  $\mu\text{l}$  elektrokompente Zellen und 1-3  $\mu\text{l}$  Plasmid-Lösung, bei der Transformation von ligiertem Plasmid 100  $\mu\text{l}$  elektrokompente Zellen und 5-10  $\mu\text{l}$  Plasmid-Lösung eingesetzt. Beide Komponenten wurden zusammen für 5 min in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette inkubiert. Die Elektroporation wurde im *Gene Pulser*<sup>®</sup> (BioRad) mit den folgenden Einstellungen durchgeführt: 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6,25 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0 - 4,5 ms Zeitkonstante und RT. Direkt nach erfolgtem Potentialpuls wurde 1 ml dYT-Medium in die Küvette gegeben, gründlich resuspendiert und der Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Transformationsansatz wurde im Anschluss für eine Std bei 800 U/min und 37 °C auf dem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellsuspension (20  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$ ) auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Mit dem restlichen Ansatz wurden 50 ml selektives dYT-Medium beimpft.

---

### 3.1.5 Produktion von Proteinen in *Escherichia coli*

---

Zur löslichen Produktion von Proteinen wurde die jeweilige Kultur bei 37 °C sowie 200 U/min kultiviert und die Expression bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,8 durch Zugabe des jeweiligen Induktionsmittels (i. d. R. IPTG) induziert. Die Expression erfolgte anschließend bei 200 U/min im Inkubationsschüttelschrank (Certomat<sup>®</sup> BS-1, Sartorius). Temperatur und Länge der Kultivierung waren dabei abhängig vom eingesetzten Plasmid und dem zu exprimierenden Gen. I. d. R. fand die Produktion bei 20 °C, 25 °C, 30 °C oder 37 °C statt und wurde über Nacht durchgeführt. Für Testproduktionen wurde ein Maßstab von meist 50 ml gewählt. Für weiterführende Expressionen wurde i. d. R. ein Volumen von 1 L verwendet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 4.000 U/min geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Für die Isolierung der Proteine wurde meist ein Ganzzellaufschluss wie unter 3.5.3 durchgeführt, gefolgt von einer Affinitätschromatographischen Reinigung.

---

### 3.1.6 Periplasmapräparation von Proteinen aus *Escherichia coli*

---

Zur Isolierung von ins Periplasma von *E. coli* translokalisierten Proteinen wurde die Periplasmapräparation eingesetzt. Hierfür wurde eine 1 L Zellsuspension zunächst pelletiert (4.500 U/min, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem Resuspendierungspuffer (20 mM Tris-HCl (pH=9,0), 100 mM EDTA und 20 % (w/v) Sucrose) sorgfältig aufgenommen und für 30 min unter leichtem Schwenken bei etwa 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 4.500 U/min für 10 min pelletiert und umgehend danach in 200 ml eiskaltem Puffer II (10 mM Tris-HCl (pH=8,8)) resuspendiert sowie erneut für 30 min unter leichtem Schwenken bei etwa 4 °C inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen bei 4.500 U/min für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und das Pellet verworfen. Dem Überstand wurden 130 g Ammoniumsulfat zugeführt und

dieser bis zur vollständigen Lösung des Ammoniumsulfats unter Rühren auf Eis inkubiert. Hierbei kam es zum Ausflocken der enthaltenen Proteine, die durch Zentrifugieren bei 9.600 U/min für 45 min anschließend pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Protein-Pellet in IMAC-A-Puffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, 100 mM NaCl und 1M Imidazol) oder PBS resuspendiert.

---

## 3.2 Handhabung von Hefen

---

### 3.2.1 Lagerung und Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

---

Bei Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Stamm EBY100 (2.1) eingesetzt. Die Vermehrung erfolgte in YPD-Medium (2.9.2) im Inkubationsschüttler (30 °C und 200 U/min). Nach Transformation durch Plasmid-DNA mit Auxotrophiemarker wurden die Hefezellen in SD(-Trp)-Medium (SDCAA; 2.9.2) kultiviert. Bei häufiger Verwendung wurden die Hefezellen auf YPD- bzw. SD(-Trp)-Agar (2.9.2) ausgebracht oder in Flüssigmedium bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Hefezellen nach Kultivierung pelletiert, in *freezing solution* (2.9.2) aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Zur Lagerung von Bibliotheken bei -80 °C wurden diese nach Kultivierung zunächst für 72 Std in Low-SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert, bevor die Hefezellen wie zuvor beschrieben behandelt wurden.

---

### 3.2.2 Induktion der Oberflächenpräsentation nach Wittrup *et al.*

---

EBY100 Zellen, welche zuvor durch ein Derivat des Vektors pCT (2.5.2) transformiert wurden, konnten für die Oberflächenpräsentation eines Proteins durch Fusion an das Aga2-Protein genutzt werden <sup>[126], [127]</sup>. Die  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheiten Aga1p und Aga2p liegen dabei chromosomal bzw. plasmidcodiert unter der Kontrolle von Gal-Promotoren (Gal1 bzw. Gal10) vor. Die Zellen wurden hierfür zunächst über Nacht bei 30 °C und 200 U/min in SD(-Trp)-Medium (5-100 ml; 2.9.2) kultiviert. Anschließend wurde damit frisches SD(-Trp)-Medium (20-1.000 ml; 2.9.2) inokuliert und die OD<sub>600</sub> dabei auf etwa 0,1-0,3 eingestellt. Die Hefekultur wurde weiter kultiviert (30 °C und 200 U/min) und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 die Genexpression durch Überführen in SG-Medium induziert. Hierfür wurden die Zellen zunächst pelletiert und in SG-Medium aufgenommen. Die Zelldichte wurde bestimmt und ein gewünschtes Volumen SG-Medium oder SG-Medium (+10 % PEG) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend entweder bei 20 °C und 200 U/min im Inkubationsschüttler oder, bei Zugabe von PEG, bei 20 °C, stehend, im Inkubator für 72 Std inkubiert.

---

### 3.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

---

#### 3.3.1 Vorbereitung von verwendeten Geräten und Lösungen

---

Hitzestabile Geräte wurden vor Verwendung bei etwa 200 °C für mindestens 20 min sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden vor Gebrauch mit 70 % (v/v) Ethanol bzw. Isopropanol gereinigt und anschließend getrocknet. Nicht hitzestabile Lösungen wurden, wenn möglich, in konzentrierter Form als Stammlösung hergestellt und unter Verwendung eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

---

#### 3.3.2 Reinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

---

Um Proteine und andere hydrophobe Verunreinigungen zu entfernen, wurden DNA-Lösungen mit Phenol und Chloroform extrahiert. Der DNA-Lösung wurde hierfür 1 Vol Phenol sowie 2 Vol Chloroform zugegeben und gründlich durch vortexen gemischt. Um wässrige und organische Phase zu trennen, wurde die Lösung für 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 1 Vol Chloroform zugegeben. Die Lösung wurde wieder durch Vortexen gemischt und bei 13.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und, wie unter 3.3.3. beschrieben, eine Ethanol/Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt.

---

#### 3.3.3 Präzipitation von DNA mittels Ethanol und Ammoniumacetat

---

Die Präzipitation oder Fällung von DNA mittels Ethanol und Ammoniumacetat wird zur Konzentrierung von DNA und Entfernung von Salzen, Proteinen sowie freien Nukleotiden verwendet. Der die DNA enthaltenden wässrigen Lösung wurde 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Vol 98 % (v/v) Ethanol *p.a.* zugegeben, gründlich durch vortexen gemischt und für 1 Std bei -20 °C gefällt. Anschließend konnte die DNA bei 4 °C und 13.200 U/min für 30 min pelletiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet bei 37-45 °C getrocknet, um Ethanol-Reste zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet im gewünschten Volumen *Aqua bidest* aufgenommen.

---

#### 3.3.4 Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten durch Sucroседichtegradientenzentrifugation

---

Die Methode der Sucroседichtegradientenzentrifugation diente der Trennung von linearisierter Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau in präparativen Mengen. Zunächst wurde ein Sucrose-Gradient (10-30 % (w/v)) unter Zuhilfenahme einer Gradi-

enten-Mischkammer in den Zentrifugenröhrchen (Open Top Polyclear™ Centrifuge Tube) hergestellt. Die geschnittene Plasmid DNA (max. 200 µg und 200 µl) wurde anschließend vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und mit Paraffinöl überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden austariert und ein Schwenkbecherrotor SW41TI mit den Röhrchen beladen. Die Dichtegradientenzentrifugation (30.000 U/min, 21 Std, 15 °C) wurde in einer Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge unter Vakuum durchgeführt. Für die Fraktionierung des Gradienten wurden die Zentrifugenröhrchen anschließend vorsichtig aus dem Rotor entfernt, in einem Stativ fixiert und an der Unterseite mit einer Kanüle punktiert. Es wurden Fraktionen zu etwa 500 µl gesammelt und diese anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.5) analysiert. Die Plasmid-DNA in den jeweiligen Fraktionen wurde anschließend mittels Ammoniumacetat und Ethanol (3.3.3) gefällt.

---

### 3.3.5 Agarosegelelektrophorese

---

Die Auftrennung von doppelsträngigen DNA- bzw. einzelsträngigen RNA-Fragmenten wurde standardmäßig mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode werden DNA/RNA-Gemische über ein horizontales Agarosegel nach dem Kriterium der Größe aufgetrennt. Hierzu wurde ein horizontales Agarosegel in einer Agarosegel-Apparatur gegossen, mit TAE-Puffer überschichtet und nach Auftragen der mit 1/5 Vol Sucrosefarbmarker versetzten Proben ein elektrisches Feld (80-125 V) angelegt. Die DNA/RNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung der Phosphodiestergruppen entlang des elektrischen Feldes in Richtung der Anode. Die Auftrennungen erfolgten in Agarosegelen mit Konzentrationen von 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer. Zur Visualisierung der DNA/RNA wurden der Agaroselösung nach Abkühlen auf etwa 60 °C 5 µg/ml Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) zugegeben <sup>[182]</sup>. Das Ethidiumbromid wurde durch UV-Licht (Wellenlänge: 254-366 nm) angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von etwa 590 nm in einer Geldokumentationskammer dokumentiert. Eine Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA/RNA verstärkt die Fluoreszenzintensität und es kommt zu einer erhöhte Quantenausbeute <sup>[183]</sup>. Zur Orientierung nach der Auftrennung wurde ein DNA-Standard-Marker (siehe 2.3.1) verwendet.

---

### 3.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen mittels des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kits* (Promega)

---

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen oder einer PCR, wurde das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* der Fa. Promega eingesetzt. Zur Isolation von spezifischer DNA aus einem Gemisch, wurde die DNA zuvor durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung von DNA aus einem Agarosegel oder einem PCR-Mix erfolgte nach Vorgaben des Herstellers mit dem

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega). Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

---

### 3.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

---

#### 3.3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

---

Um Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* in Ausbeuten von bis zu 15 µg zu präparieren, wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Fa. Promega verwendet. Auch hier wurden die Herstellerangaben angewendet. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

---

#### 3.3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA in semi-präparativen Mengen (Midi-Präparation) mit Hilfe des Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System (Promega)

---

Um Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* in Ausbeuten von bis zu 200 µg zu präparieren, wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Fa. Promega verwendet. Wieder wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

---

#### 3.3.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen mittels CsCl-Gradient

---

Die Herstellung und Isolation von präparativen Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mithilfe eines Cäsiumchlorid-Gradienten. Hierfür wurde zunächst die Plasmid-DNA in *E. coli* repliziert. 1 l LB-Selektionsmedium wurde mit *E. coli* inokuliert, über Nacht kultiviert anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 63 ml Lösung C-I (Tabelle 7) resuspendiert, 7 ml Lysozym-Lösung (Tabelle 7) hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 88 ml der Lösung C-II (Tabelle 7). Die Suspension wurde vorsichtig invertiert und erneut für 5-10 min bei RT inkubiert. Zum Abschluss wurden 66 ml der Lösung C-III (Tabelle 7) zugeführt, die Suspension gut durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefallene genomische DNA und Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4.400 U/min und 4 °C für 15 min sedimentiert. Zellrückstände wurden mithilfe von Filterpapier entfernt. Dem gereinigten Überstand wurden dann 0,6 Vol. Isopropanol hinzugefügt, der Ansatz gründlich durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach konnte die nun ausgefallene Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 13.000 U/min und 4 °C für 45 min präzipitiert werden. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut pelletiert und bei 50 °C getrocknet.

Zur Entfernung linearer DNA und RNA wurde der Ansatz nun mittels Cäsiumchlorid-Gradienten aufgetrennt. Die Auftrennung der einzelnen Komponenten erfolgt hierbei isopyknisch, also nach der Dichte, in der CsCl-Lösung. Zunächst wurde das getrocknete Pellet in 25 ml TE-Puffer gelöst. Der Lösung wurden dann 1 g/ml CsCl zugeführt und diese bis zum voll-



ständigen Lösen gemischt. Zuletzt wurden dem Ansatz 80  $\mu\text{l/ml}$  Ethidiumbromid-Stammlösung zugeführt und je 10 ml in ein *Quick Seal*-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die Proben in den Zentrifugenröhrchen wurden mit Paraffinöl beschichtet und versiegelt. Die Gradientenzentrifugation wurde in der *Beckmann Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultrazentrifuge* im *Vertikalrotor VTI-50* bei 45.000 U/min und 20 °C für 36 Std durchgeführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden im Anschluss in einem Stativ fixiert, seitlich in Höhe der *supercoiled* Plasmid-DNA mit einer Kanüle punktiert und die DNA abgezogen.

Durch wiederholtes Ausschütteln im Scheidetrichter unter der Verwendung von Isoamylalkohol und dreimaliger Dialyse gegen 5 l TE-Puffer (Tabelle 7) wurde danach das Ethidiumbromid entfernt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch eine Ammoniumacetat-Fällung in Ethanol gefällt und erneut in TE-Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Entfernung der RNA wurde der Probe DNase-freie RNase (10  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben und der Ansatz in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt, in dem 4 ml NaCl-Lösung (1M) vorgelegt waren. Die Probe wurde wieder mit Paraffinöl überschichtet und in der Ultrazentrifuge im Schwenkrotor SW-41 bei 35.000 U/min und 20°C, für 6 Std zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert

---

### 3.3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

---

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen wurden Einzelklone zunächst in SC-Medium über Nacht bei 30 °C und 180 U/min kultiviert. Etwa 4 ml Hefekultur wurden anschließend pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200  $\mu\text{l}$  Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert und 200  $\mu\text{l}$  Phenol sowie 200 mg Glasperlen ( $\phi=0,5$  mm) zugegeben. Der Zellaufschluss fand bei 1300 U/min und RT für 10 min auf dem Thermomixer statt. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 4.500 U/min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgenommen sowie in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die darin enthaltene DNA weiter zu reinigen, wurden eine Standard Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ammoniumacetat-Fällung in Ethanol vorgenommen. Diese DNA-Präparation ermöglichte jedoch keine saubere Isolierung von Hefe Plasmid-DNA. Die Lösung enthielt teilweise noch genomische DNA. Für eine anschließende Sequenzierung oder Transformation von *E. coli* war diese Methode jedoch in der Regel ausreichend.

---

### 3.3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA in wässrigen Lösungen

---

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen nach Präparationen oder Präzipitationen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz im Spektralphotometer oder im BioSpec-Nano (Fa. Shimadzu) ermittelt. Messungen im Spektralphotometer (UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu) erfolgten in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1 ml. Für die Messungen im BioSpec-Nano wurde ein kleiner Tropfen mit einem Volumen von 3  $\mu\text{l}$  auf die

Messfläche gegeben. Als Nullwert wurde die jeweilige wässrige Lösung (i. d. R. Aqua bidest) verwendet. Eine gemessene OD<sub>260</sub> von 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 35 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml ssDNA. Das Maß an Verunreinigungen wurde durch eine zusätzliche Messung bei einer OD<sub>280</sub> ermittelt und der Quotient beider Messungen (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) ermittelt. Ein Quotient von 2 entspricht einer proteinfreien Lösung.

---

### 3.3.10 Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung (454 Sequencing)

---

Für die Hochdurchsatzanalyse von VHH-Antikörperfragment-Bibliotheken wurde die Hochdurchsatz Amplicon Sequenzierung eingesetzt. Hierfür wurde die Plasmid-DNA der zuvor hergestellten VHH-Antikörper-Bibliotheken aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* isoliert (3.3.7.2, 3.3.8) und als Matrize in einer PCR eingesetzt. Dabei wurden die Bereiche amplifiziert, die anschließend sequenziert werden sollten. Die verwendeten Oligonukleotide besaßen *Multiplex Identifier* (MID), kurze Basensequenzen, die der späteren Zuordnung der einzelnen Sequenzen dienten. In einer anschließenden Emulsions-PCR wurden die DNA-Fragmente in Mikroreaktoren (Wasser-Tröpfchen in Öl) vereinzelt und unter Verwendung spezieller Oligonukleotide amplifiziert und als Einzelstrang an Partikel fusioniert. Die Emulsion wurde anschließend aufgebrochen und die Konzentration an Partikeln bestimmt, um sie für die Sequenzierung einsetzen zu können. Die Sequenzierung wurde mit dem GS Junior System (Fa. Roche) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und die anschließende Sequenzierung wurden nach Vorgaben der Fa. Roche und mit den entsprechenden Kits durchgeführt. Die Analyse der Daten wurde mit dem *GS Junior System Software Package v2.7*, *Jembooss* (Vers. 1.5), *Jalview* (Vers. 2) und *R* (Gentleman, Ihaka *et al.*) vorgenommen.

---

## 3.4 Enzymatische Manipulation von DNA

---

### 3.4.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

---

Die Spaltung von DNA wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für einen Restriktionsverdau mit mehreren Enzymen gab es zwei unterschiedliche Strategien. Bei mindestens 50 % Aktivität aller Enzyme in einem geeigneten Puffer und gleichen Temperaturbedingungen, wurden diese simultan verwendet. Waren unterschiedliche Bedingungen nötig, wurde der Restriktionsverdau seriell durchgeführt. Die eingesetzte Menge an DNA wurde abhängig vom jeweiligen Experiment gewählt und betrug zwischen 100 ng/µl und 500 ng/µl Endkonzentration im Reaktionsansatz. Analytische Restriktionen wurden für 1-3 Std durchgeführt, präparative dagegen meist über Nacht oder bis zu 48 Std.



---

### 3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

---

Die Ligation zweier sich komplementär zusammenlagernden DNA-Fragmente, welche zuvor spezifisch durch Restriktionsendonukleasen verdaut worden waren, erfolgte durch die Verwendung der T4-DNA-Ligase. Hierbei wird die Esterbindung zwischen Phosphatrest des einen und der Desoxyribose des anderen DNA-Fragments unter ATP-Verbrauch katalysiert. Die Ligationen wurden nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. In der Regel entsprach dies dem fünffachen Überschuss an DNA-Insert gegenüber dem Vektor-Fragment mit 1 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamt-Volumen von 20  $\mu$ l. Die Inkubation erfolgte i. d. R. für 1 Std bei 20 °C. Vor der Transformation in *E. coli* wurde die Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert und präzipitiert (siehe 3.3.3).

---

### 3.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

---

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten <sup>[184]–[186]</sup>, wurde in dieser Arbeit in unterschiedlicher Weise mit verschiedenen Polymerasen angewandt. Diese Methode ermöglicht, neben der einfachen Amplifikation eines DNA-Templates, kleine Manipulationen an DNA-Fragmenten sowie die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz in einem großen Gemisch an DNA-Matrizen.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l in *Multiply*<sup>®</sup>- $\mu$ Strip PCR-Gefäßen (Fa. Sarstedt) durchgeführt. I. d. R. wurden 0,5-100 ng Matrizen-DNA, 10 nM dNTPs, 10 pMol je Oligonukleotid und 5 U Polymerase eingesetzt. Um Evaporation von Flüssigkeit aus dem PCR-Ansatz zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Das PCR-Protokoll mit Längen und Temperaturen der einzelnen Reaktions-Schritte wurde abhängig von Länge und Basenzusammensetzung der DNA-Matrize und Oligonukleotide sowie der verwendeten Polymerase definiert. Als Grundlage dienten auch hier die Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Die genauen PCR-Protokolle sind im Ergebnisteil der jeweiligen Versuchsabschnitte aufgeführt. Ein Standard-Protokoll für die Verwendung von Taq-Polymerase bzw. Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase ist nachfolgend zusammengefasst.

Tabelle 10: Standard-Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Für den Einsatz von Taq-Polymerase (NEB) wurden 5  $\mu\text{l}$  eines 10x *Taq reaction buffers* verwendet, für den von Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase 10  $\mu\text{l}$  eines 5x *High Fidelity buffers*.

Reagenz	Konzentration [M]	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration [M]
<b>Puffer (Taq/Phusion)</b>	10x/5x	5-10	1x
<b>dNTP-Mix</b>	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	10 nM
<b>Oligo_up</b>	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Oligo_lo</b>	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Template-DNA</b>	0,1-100 ng	x $\mu\text{l}$	-
<b>Polymerase (Taq/Phusion)</b>	5/2 U/ $\mu\text{l}$	1/0,5 $\mu\text{l}$	5/01 U
<b>Aqua bidest</b>	-	Add 50 $\mu\text{l}$	-

Tabelle 11: Standard-Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Taq-Polymerase der Fa. Fermentas sowie des AK Kolmar (TUD) und 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen.

Reagenz	Konzentration [M]	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration [M]
<b>Puffer</b>	10x	5 $\mu\text{l}$	1x
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	10x	5 $\mu\text{l}$	1x
<b>dNTP-Mix</b>	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	10 nM
<b>Oligo_up</b>	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Oligo_lo</b>	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Template-DNA</b>	0,1-100 ng	x $\mu\text{l}$	-
<b>Polymerase</b>	5 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 U
<b>Aqua bidest</b>	-	Add 50 $\mu\text{l}$	-

Tabelle 12: Standard PCR-Protokoll für die Verwendung von Taq-Polymerase (NEB) bzw. Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB).

	Taq/Phusion	Taq/Phusion
Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sek]
1x	95/98	120/30
30-35x	95/98	30/10
	52-62/65	30/20
	68/72	60/15 pro kB
1x	68/72	300
-	4	Bis zur Lagerung

Tabelle 13: Standard PCR-Protokoll für die Verwendung von Tag-Polymerase der Firma Fermentas und des AK Kolmar (TUD).

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sek]
1x	98	30
30-35x	98	30
	52-62	30
	72	60 pro kB
1x	72	300
-	4	Bis zur Lagerung

#### 3.4.4 Kolonie PCR mit *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kolonie-PCR dient der Durchmusterung von Bakterien- und Hefe-Kolonien nach einem gewünschten Plasmid oder DNA-Fragment. Hierfür wird dem Protokoll einer Standard-PCR zu Beginn ein zusätzlicher Denaturierungsschritt vorangesetzt. Dieser Schritt wurde bei 98 °C für 3 min für *E. coli* bzw. 5-10 min für *S. cerevisiae* durchgeführt. Er diente dem Aufschluss des verwendeten Organismus sowie der Denaturierung der enthaltenen Proteine. Die zu analysierenden Einzelklone wurden von einer Agarplatte gepickt und im PCR-Ansatz gelöst. Dieser enthielt zu Beginn für den Denaturierungsschritt alle Komponenten bis auf die Polymerase, die direkt im Anschluss vor der eigentlichen PCR-Reaktion hinzugegeben wurde. Das PCR-Protokoll der darauffolgenden Schritte erfolgte wie in 3.4.3 beschrieben.

Da Hefezellen weitaus hitzestabiler sind als *E. coli* Zellen, musste häufig zunächst die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert werden. Hierfür wurden die Hefeklonen zunächst über Nacht in Selektionsmedium kultiviert. Anschließend wurden Zellen aus 4 ml Kultur pelletiert (4.500 U/min, 3 min, RT), in 200  $\mu$ l Hefe-Lysispuffer resuspendiert und 200  $\mu$ l Phenol sowie 200 mg Glasperlen ( $\varnothing=0,5$  mm) hinzugefügt. Der Ansatz wurde anschließend für mindestens 10 min bei RT und 1300 U/min (Thermomixer) geschüttelt, um die Hefezellen aufzuschließen. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 U/min, RT, 10 min) und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die enthaltene DNA wurde dann durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (3.3.2) gereinigt und mittels Ammoniumacetat und Ethanol (3.3.3) gefällt.

---

### 3.4.5 *Splicing by overlap extension* PCR (SOE-PCR)

---

Diese Methode stellt eine Möglichkeit dar, zwei Gene *in vitro* zu fusionieren oder Punktmutationen einzubringen <sup>[187], [188]</sup>. Die *splicing by overlap extension* PCR (SOE-PCR) enthält drei einzelne PCR-Reaktionen, wobei die ersten beiden einer Standard-PCR-Reaktionen (siehe 3.4.3) gleichen und der Herstellung der zu fusionierenden DNA-Matrize dienen. Durch die Oligonukleotide werden dabei homologe Bereiche generiert, welche in der dritten PCR-Reaktion als *annealing*-Bereich der beiden Matrizen dienen. In der dritten PCR-Reaktion werden die PCR-Produkte aus den ersten beiden PCR-Reaktionen zusammen eingesetzt. Zunächst werden 10 Zyklen ohne Oligonukleotide durchgeführt, in denen die beiden Templates miteinander hybridisieren und von der Polymerase komplettiert werden. Das nun fusionierte Template wird nach Zugabe der beiden außen hybridisierenden Oligonukleotide in den folgenden 30 Zyklen amplifiziert.

---

## 3.5 Proteinchemische Arbeitsmethoden

---



---

### 3.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässrigen Lösungen

---

Die Konzentration von Proteinen in wässrigen Lösungen kann durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge bei 280 nm ermittelt werden. Die Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie die Disulfidbrücken von Cysteinen absorbieren bei dieser Wellenlänge. Mit der gemessenen Absorption bei 280 nm lässt sich der Proteingehalt der Lösung anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins <sup>[189]</sup> (Formel 1) und der nachfolgenden Formel (Formel 2) unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmen.

$$\varepsilon(280)(\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = (n_{\text{Trp}} \cdot 5.500) + (n_{\text{Tyr}} \cdot 1.490) + (n_{\text{Cystein}} \cdot 125) \quad (1)$$

$n$  = Anzahl der jeweiligen Aminosäure bzw. Disulfidbrücke im entsprechenden Protein.

$$c_{\text{Protein}} = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

$c_{\text{Protein}}$  = Konzentration des zu bestimmenden Proteins

$E$  = Extinktion bei 280 nm

$\varepsilon$  = molekulare dekadische Extinktionskoeffizient

$d$  = Schichtdicke der Küvette.

Die Messungen im Spektralphotometer (UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu) erfolgten stets in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm. Als zweite Möglichkeit diente die Messung im BioSpec-Nano (Fa. Shimadzu). Hierbei wurde jeweils ein kleiner Tropfen mit einem Volumen von 3  $\mu\text{l}$  auf die Messfläche gegeben. Als Nullwert wurde das reine jeweilige wässrige Lösungsmittel ohne Protein verwendet (i. d. R. Aqua bidest oder 1x PBS).

### 3.5.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Proteinen oder Proteingemischen ist es möglich, sie der Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurde die Methode der Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewandt <sup>[179], [190]</sup>. Die SDS-PAGE wird unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt und als anionisches Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. SDS unterbricht nichtkovalente Wechselwirkungen der Proteine und hebt so Sekundär- und Tertiärstrukturen größtenteils auf. Des Weiteren überdeckt es die Eigenladungen von Proteinen. Dadurch entstehen Micellen mit ca. 1,4 g SDS pro g Protein, die eine konstante negative Ladung pro Masseneinheit aufweisen. Die vollständige Reduktion der Disulfidbrücken wird durch Zugabe von DTT (Dithiothreitol) und Harnstoff sowie anschließendes Erhitzen der Probe auf 98 °C für 10 min erreicht. Die netzartige Struktur des Polyacrylamidgels entsteht durch Co-Polymerisation von Acrylamid- und Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisacrylamid)-Monomeren nach Zugabe eines Radikalstarters (APS). Die Porengröße des Acrylamidgels lässt sich durch die Gesamtmenge an Acrylamid sowie dem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid variieren.

### 3.5.2.1 Herstellung von 12,5 % (v/v) Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden unter Zuhilfenahme von Gelgießkammern (Multiple Gel Caster, Hoefer) hergestellt. Die einzelnen Gele wurden dabei in aneinandergereihten Formen gegossen und erlaubten die Herstellung von bis zu 5 bzw. 10 Gelen gleichzeitig. Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen, das einen höheren Vernetzungsgrad besitzt und der Trennung der Proteine dient. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit 97 % (v/v) Isopropanol überschichtet und in diesem Zustand ausgehärtet. Anschließend wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Taschenkämme zügig in die Formen gesteckt wurden. Das Protokoll zur Herstellung von Trenn- sowie Sammelgel sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für Polyacrylamidgele nach Laemmli.

	Chemikalie	Volumen
Trenngel	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1 (Roth))	16,8 ml
	Trenngelpuffer	8 ml
	Aqua bidest	6,8 ml
	75 % (w/v) Glycerin	8 ml
	10 % (w/v) SDS	400 µl
	10 % (w/v) APS	200 µl
	TEMED	40 µl
Sammelgel	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1 (Roth))	2,8 ml
	Sammelgelpuffer	5,2 ml
	Aqua bidest	8 ml
	75 % (w/v) Glycerin	4 ml
	10 % (w/v) SDS	200 µl
	10 % (w/v) APS	160 µl
	TEMED	40 µl

Vollständig polymerisierte Acrylamidgele wurden einzeln in befeuchtete Tücher gewickelt und gemeinsam in einem Autoklavierbeutel bei 4 °C gelagert.

---

### 3.5.2.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

---

Zur Vorbereitung wurden die Proben in einem Reaktionsgefäß mit mindestens  $\frac{1}{4}$  Vol HOECHST-Puffer (mit DTT) versetzt und für 10 min bei 98 °C auf dem Heizblock erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um vaporisierte Flüssigkeit wieder zu sedimentieren. Die Polyacrylamidgele wurden in die Elektrophoreseapparatur (DualGel Caster, Hoefer™) gespannt und diese mit 1x Laemmli-Puffer (Tabelle 7) gefüllt. Nun wurden die Taschenkämme entfernt und die Proben aufgetragen. Eine der Taschen wurde mit Protein-Marker (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*; *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (MBI Fermentas)) beladen. Die Elektrophorese wurde mit 35 mA und maximal 200 V pro Gel durchgeführt.

---

### 3.5.2.3 Entwicklung eines SDS-Polyacrylamidgels

---

Um die aufgetrennten Proteine visualisieren und analysieren zu können, wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue-R-250 eingesetzt. Dieser Farbstoff bildet durch seine Sulfonat-Gruppen ionische Wechselwirkungen mit den kationischen und nichtpolaren Aminosäure-Seitenketten der Proteine aus <sup>[191]</sup>. Die Färbung erfolgte in einer Schale mit 10 ml PAG-Färbelösung sowie 10 ml 30 % (v/v) Essigsäure. Das Gel wurde für eine schnellere und deutlichere Färbung in der Mikrowelle mehrere min erhitzt. Die Entfärbung des Gels erfolgte mittels Entfärbelösung, bestehend aus 10 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure in Wasser, ebenfalls in einem Mikrowellenherd.

---

### 3.5.2.4 Immunchemischer Nachweis mittels *Western Blot*

---

Um Proteine im Anschluss an eine Gelelektrophorese für immunchemische Nachweise zugänglich zu machen, bedient man sich der Methode des *Western Blottings*. Dabei werden die Proteine über ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wobei die negative Beladung der Proteine durch das SDS aus der zuvor durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophorese genutzt wird <sup>[192], [193]</sup>. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese aus der Gelkammer genommen und auf eine Nitrozellulose-Membran zwischen zwei Lagen, bestehend aus je 5-7 Filterpapieren, in eine Blot-Apparatur (Novoblot, Pharamcia/LKB) gelegt. Alle Komponenten wurden dabei gründlich mit Transferpuffer (Tabelle 7) befeuchtet. Der Transfer erfolgte bei 12 V für 1-1,5 Std. Für den anschließenden immunchemischen Nachweis wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst in einer Schale mit Blocklösung (3 % (w/v) Milchpulver in PBS) über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach drei Waschschritten mit etwa 30 ml PBS wurde die Membran für 1-2 Std bei RT in 25 ml Antikörperlösung auf dem Taumelschüttler inkubiert. Die Membran wurde daraufhin dreimal für 5 min mit 30 ml PBS-Tween und

dreimal für 5 min mit 30 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Membran für 1-2 Std in 25 ml Antikörperlösung II (i. d. R. 5  $\mu$ l Anti-Maus-alkalische Phosphatase-Antikörper (1 mg/ml), 3 % (w/v) Milchpulver in PBS), ebenfalls auf dem Taumelschüttler. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 min mit PBS-Tween sowie PBS gewaschen und anschließend drei Waschschrte mit Aqua bidest durchgeführt, um das Phosphat zu entfernen. Die Entwicklung erfolgte in 25 ml alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer (Tabelle 7) mit 12,5  $\mu$ l NBT (Tabelle 7) und 75  $\mu$ l BCIP (Tabelle 7). Die Membran wurde bis zur Entstehung eines deutlichen sichtbaren Niederschlags auf dem Taumelschüttler inkubiert und mit PBS abgestoppt. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren der Membran.

---

### 3.5.3 Zellaufschluss von *Escherichia coli*

---

#### 3.5.3.1 Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell Press*

---

Der mechanische Zellaufschluss von Mikroorganismen kann mittels *french press* in einer *french pressure cell press* (*french pressure cell press*, SLM AMINCO) durchgeführt werden. Die Zellen werden dabei unter hohem Druck (etwa 83 bar) durch ein kleines Ventil gepresst und durch die dabei entstehenden Scherkräfte aufgeschlossen. Die *french pressure cell press* besteht aus einer externen Hydraulikpumpe, die einen Hubkolben in einen Stahlzylinder presst, in dem die Zellprobe komprimiert wird. Die Zellsuspension wird dann unter hohem Druck durch ein dünnes Auslassventil gepresst. Beim Austritt der Zellprobe aus dem Ventil und dem Erreichen atmosphärischen Drucks entsteht Scherstress, welches zum Aufschluss der Zellen führt. Die Zellsuspension wurde vor dem Zellaufschluss bei 4.000 U/min für 15 min pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde das Zellepellet in 10 ml PBS aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Nachdem die Probe wieder vollständig aufgetaut war, wurden die Zellen durch dreifache Passage über die *french pressure cell press* aufgeschlossen. Dabei wurde die Zellprobe permanent auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension bei 13.500 U/min für 30 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge 6K15, Sigma) und danach, abhängig von dem produzierten Protein, chromatographisch weiter gereinigt.

---

#### 3.5.3.2 Zellaufschluss mittels *Cell Disruptor*

---

Eine weitere Möglichkeit des Zellaufschlusses stellt die Verwendung eines *cell disruptors* dar. Das Prinzip des Zellaufschlusses ist hier dasselbe wie das im Falle der *french pressure cell Press* (siehe 3.5.3.1), lediglich der Aufbau der Apparatur unterscheidet sich. Die Vorbereitung der Zellprobe wird hier auf gleiche Weise durchgeführt (siehe 3.5.3.1). Nach Einfrieren bei -80 °C und anschließendem vollständigen Auftauen wurde die Zellsuspension durch dreimalige Passage über den *cell disruptor* (Tabelle 6) aufgeschlossen. Auch hier wurde die Probe permanent gekühlt und nach dem Zellaufschluss durch Zentrifugation bei 13.500 U/min in einem ersten Schritt gereinigt. Weitere Reinigungsschritte wurden abhängig vom produzierten Protein gewählt.



---

### 3.5.4 *Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography (IMAC)*

---

Zur Reinigung von Proteinen, welche über ein His-Epitop verfügen, bedient man sich der *immobilized metal chelate affinity chromatography* (IMAC). Hier nutzt man die Eigenschaft von metallchelatierenden Gruppen, um multivalente Übergangsmetall-Ionen zu binden. Diese können so ein oder mehrere Koordinationsbindungen zur Komplexbildung basischer Aminosäure-Seitenketten in Proteinen bereitstellen <sup>[194]–[196]</sup>. Um eine effektive Immobilisierung eines Proteins mittels His-Tag Epitop an einer *immobilized metal chelate affinity chromatography* zu gewährleisten, benötigt ein solches Affinitäts-Tag mindestens fünf aufeinanderfolgende Histidine. Als Säulenmaterial wurde *chelating sepharose* (GE Healthcare) verwendet. Als multivalentes Metallion, das am Säulenmaterial immobilisiert wurde, diente  $\text{Ni}^{2+}$  (100 mM  $\text{NiCl}_2$ ). Um die immobilisierten Fusionsproteine wieder von der Säule zu verdrängen, wurde mit einer ansteigenden Konzentration Imidazol eluiert.

Zu Beginn der IMAC wurde die Säule mit 10 ml 100 mM  $\text{NiCl}_2$  beladen, um  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen am Säulenmaterial zu immobilisieren. Der Beladung folgten zwei Waschschrte mit 10 ml Aqua bidest, um nicht gebundenes  $\text{NiCl}_2$  zu entfernen. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit 10 ml PBS. Anschließend wurde der Zellaufschluss über die Säule gegeben, um das His-Tag-Fusionsprotein an der Säule zu immobilisieren. Die Säule wurde erneut mit 10 ml PBS gewaschen und dann je 10 ml einer steigenden Reihe Imidazol in PBS (20 mM, 40 mM, 60mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM Imidazol in PBS) über die Säule gegeben, um das immobilisierte Protein wieder von der Säulenmatrix zu eluieren. Die einzelnen Fraktionen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach Gebrauch der Säule wurden die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen mit 10 ml [0,1 M] EDTA eluiert und die Säule zur Lagerung im Kühlschrank mit 20 % (v/v) Ethanol beschichtet.

---

### 3.5.5 *Fast Protein Liquid Chromatography - FPLC*

---

Zur Reinigung von VHH-Antikörpern wurde die chromatografische Auftrennungen mittels FPLC (Fa. Amersham Pharmacia Biotech und GE Healthcare) eingesetzt. Die verschiedenen eingesetzten Pufferlösungen wurden über ein Pumpensystem gemischt und über die Säule befördert. Die Detektion von Proteinen in der Säulenmatrix wurde über ein UV-Detektionssystem ermöglicht. Zur Auftrennung wurden zwei verschiedene Säulen eingesetzt, die nachfolgend kurz beschrieben werden.

#### *HisTrap<sup>TM</sup> HP-Säule (GE Healthcare)*

Diese Säulenmatrix ermöglicht die Reinigung von Proteinen mit His-Epitopen und entspricht der IMAC (3.5.4). Die *HisTrap<sup>TM</sup> HP-Säule* hat ein Säulenvolumen von 1 ml. Die Säule wurde vor Benutzung zunächst mit  $\text{NiCl}_2$  beladen und anschließend mit IMAC-Puffer äquilibriert. Die Elution erfolgte mittels ansteigender Konzentration an Imidazol.

### ***HiTrap™ Protein A HP-Säule (GE Healthcare)***

Die hier verwendete Säulenmatrix ist mit Protein A beladen, die es zum Beispiel ermöglicht, Antikörper oder VHH-FC-Fusionsproteine zu reinigen. Die Elution erfolgte durch Änderung des pH. Zur Vorbereitung der Säule wurde mit 30 ml Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, 3,5 M Natriumchlorid, pH=7,4) äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde erneut mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Für die Elution wurden 10 ml [0,1 M] Zitronensäure (pH=3,0) eingesetzt. Das Eluat wurde ebenfalls in 1 ml Fraktionen gesammelt und dabei 100 µl [1M] Tris-HCl (pH =9,0) in die Reaktionsgefäße für die Neutralisierung des pH-Wertes vorgelegt.

### **3.5.6 Dialyse von Proteinen**

Zum Entfernen von Peptiden, kleinen Proteinen und Ionen oder zum Überführen von Proteinen in einen anderen Puffer, bedient man sich der Dialyse. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Diffusion. Die hierfür zum Einsatz kommenden Dialysemembranen haben unterschiedliche Porengrößen für einen definierten Molekulargewichtsausschluss. Diese Molekulargewichtsausschlussgröße (*molecular weight cutoff-Wert*, MWCO-Wert) gibt den Grenzwert des Molekulargewichts von Proteinen an, welche zu etwa 90 % von der Membran ausgeschlossen werden. Moleküle unterhalb des *cutoff*-Wertes diffundieren somit aus dem Dialyseschlauch und werden über die Dauer der Dialyse stark verdünnt.

Für eine Dialyse wurden 5 l Puffer (i. d. R. PBS) sterilfiltriert und der Dialyseschlauch (Zellu Trans Dialysemembran, Carl Roth GmbH & Co KG), gefüllt mit der Proteinlösung, in den Puffer gegeben. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde der Puffer vollständig gewechselt und der Dialyse-Ansatz nochmals für einige Std bei 4 °C inkubiert.

### **3.5.7 Biotinylierung von Proteinen**

Um Proteine spezifisch markieren zu können, wurden diese während dieser Arbeit häufig mit Biotin kovalent verknüpft. Biotin bindet an Avidin und Streptavidin bei einer Affinitätskonstante von etwa  $10^{-15}$  M. Die starke Bindung an Streptavidin sowie das geringe Molekulargewicht des Sulfo-NHS-LC Biotins (556,59 g/mol; Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien) machen dieses Molekül zu einem ausgezeichneten Marker und Bindungspartner.

Das getrocknet vorliegende Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde zunächst in PBS gelöst und für die Biotinylierungsreaktion im zehnfach molaren Überschuss mit dem Zielprotein eingesetzt. In einer Biotinylierungsreaktion wurden 0,1-10 mg Protein in 0,5-2 ml eingesetzt. Biotin- und Protein-Lösung wurden vermengt und für mindestens 1 Std auf Eis inkubiert. Abschließend wurde überschüssiges Biotin durch Verwendung einer PD10-Desalting Säule (Sigma-Aldrich Co. LLC) abgetrennt. Die Trennung erfolgte hierbei über den Größenausschluss. Die Säule wurde zunächst viermal mit PBS äquilibriert. Dazwischen wurde jedes Mal für 2 min bei

4.500 U/min zentrifugiert. Nach Auftragen der Probe wurde 2 min bei 2.500 U/min zentrifugiert und somit das Protein durch die Säule transportiert. Überschüssiges Biotin verblieb dabei im Säulenmaterial und wurde im Anschluss durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Lagerung der Säule wurde 20 % Ethanol-Lösung auf das Säulenmaterial gegeben und diese bei 4 °C gelagert. Das biotinylierte Protein wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder direkt eingesetzt.

### 3.5.8 Immunchemische Analysen unter Verwendung des TECAN GENios™ ELISA readers

Immunchemische Analysen von Blutseren zur Bestimmung der Immunantwort während einer Immunisierung, wurden im TECAN GENios™ *ELISA reader* (Tecan Trading AG) durchgeführt. Es wurden die Antikörper-Bindung im Serum vor der ersten Injektion (Präserum, Tag 0) und nach der dritten Injektion (Postserum, Tag 49) gegen ein Antigen aus dem Immunisierungscocktail verglichen, um den Anstieg des Antikörper-Titers gegen dieses Antigen zu ermitteln. Hierfür wurden das Antigen sowie Kontrollproteine in 96er Mikrotiterplatten (Nunc, Thermo Fisher; Maxisorb) durch Inkubation ü.N. bei 4-8 °C aufgebracht (*coating*). Das Antigen wurde dabei in einer Konzentration von 200 µg/ml (2% Milchpulver in PBS), die Kontrollproteine zu 1 mg/ml zugegeben (2 % Milchpulver in PBS). Das Volumen betrug 100 µl. Am nächsten Morgen wurden die Kavitäten zehnmal mit 200 µl PBS im *Washer* gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Serum für 1 Std bei RT. Hierbei wurden Verdünnungen der Seren (i. d. R. 1:100, 1:1.000 und 1:5.000) in einem Volumen von 100 µl eingesetzt. Danach wurde erneut zehn Mal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit 100 µl (0,2 µg/ml) Protein A-Alkalischer Phosphatase Konjugat durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurden die Kavitäten zehnmal mit AP-Puffer (Tabelle 7) gewaschen. Für die enzymatische Detektion wurde 100 µl p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml in AP-Puffer) zugegeben und bei RT bis zum optisch erkennbaren gelblichen Farbumschlag inkubiert. Der enzymatische Umsatz wurde im *ELISA reader* bei 405 nm ausgelesen.

### 3.5.9 *Bio-Layer Interferometry* (fortéBIO®)

Die Methode der *Bio-Layer Interferometry* (BLI) wird zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen, beispielsweise Antikörpern und Antigenen verwendet <sup>[197]</sup>. Hierbei wird die Differenz zweier, durch weißes Licht erzeugter Interferenzmuster, gemessen (Abbildung 16). Die Interferenzmuster werden dabei jeweils durch die Reflexion des weißen Lichts von zwei Schichten des Biosensors erzeugt. Der Biosensor internen Referenzschicht und der Binde-schicht an der Biosensor-Spitze, an der sich die immobilisierten oder gebundenen Proteine befinden. Dabei erzeugt eine Veränderung der Menge gebundener Moleküle eine Veränderung der reflektierten Wellenlängen (Abbildung 16). Analysiert man nun die einzelnen Wellenlängen beider Reflexionen, so entsteht ein Interferenzmuster, basierend auf konstruktiven

bzw. destruktiven Interferenzen (Abbildung 16 A und B, Graphen). Anhand dieser spezifischen Interferenzmuster können Assoziation und Dissoziation von Molekülen an Biosensoren in Echtzeit gemessen werden.

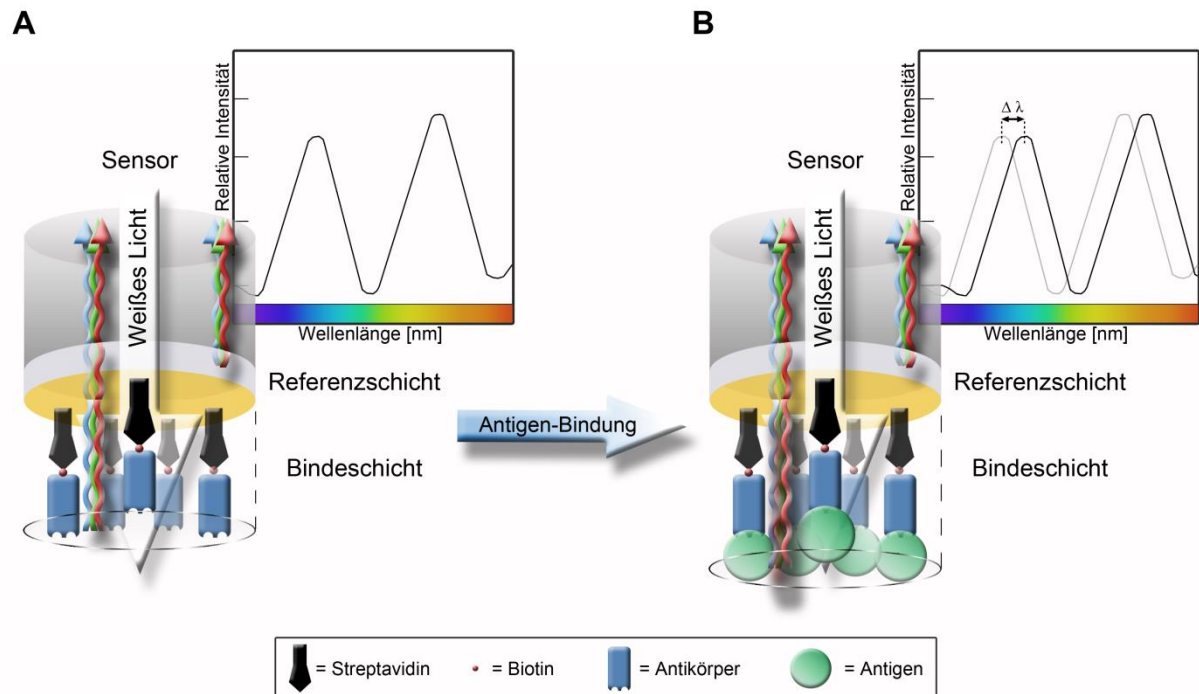


Abbildung 16: Schematische Darstellung der *Bio-Layer* Interferometrie am Beispiel eines mit Streptavidin beladenen Sensors. (A) Beladung des Sensors an der Bindeschicht (gold) mit biotinylierten Antikörper-Fragmenten. (B) Anschließende Bindung des Antigens durch die Antikörper-Fragmente an der Bindeschicht. Weißes Licht (weißer Pfeil) wird von einer internen Referenzschicht (grau) und der beladenen Bindeschicht (mit unterbrochenen Linien markierter Bereich) reflektiert, wodurch ein spezifisches Interferenzmuster entsteht (Graph, A). Durch die Bindung des Antigens (B) nimmt die Schichtdicke zu und das Interferenzmuster wird verschoben (Graph B: vor Antigenbindung=graue Linie; nach Antigenbindung=schwarze Linie). Die Differenz der beiden Interferenzmuster ( $\Delta \lambda$ ; Graph B) wird gemessen. Abbildung erstellt nach Vorlage auf [www.fortebio.com](http://www.fortebio.com).

Tabelle 15: Ablauf der durchgeführten Messungen, mit Angabe aller Einzelschritte, den verwendeten Lösungen und der jeweiligen Zeit.

Schritt	Lösung	Zeit [sek]
Baseline	PBS	200
Sensoren-Beladung	VHHs (in PBS)	300
Waschschritt	PBS	240
Assoziation	Antigen (PBS)	800
Dissoziation	PBS	800

BLI-Messungen wurden in dieser Arbeit am *Octet RED System* (fortéBIO®) durchgeführt. Für alle Messungen wurden dabei mit Streptavidin beladene Sensoren eingesetzt und biotinylierte VHH-Antikörper immobilisiert. Für die Messungen und Auswertungen wurden die Software-Pakete *Octet Data Acquisition v6.3* und *v6.4* sowie *Data Analysis v6.3* und *v6.4* verwendet. Die Messungen wurden nach dem Schema in Tabelle 15 durchgeführt. Während der Messungen wurden die Platten mit 1.000 U/min geschüttelt. Für die Bestimmung kinetischer Konstanten wurden unterschiedliche Konzentrationen des Antigens eingesetzt und gemessen. Für die Analyse der Daten wurde ein 1:1 Modell sowie ein *global fitting* Algorithmus verwendet.

---

### 3.6 Methoden zur Gewinnung und Manipulation von RNA aus dem Vollblut von *Lama glama*

---

#### 3.6.1 Immunisierungsstrategie für *Lama glama*

---

Die komplette Immunisierung des Lamas „Masko“ wurde durch die Fa. Preclinics Gesellschaft für präklinische Forschung mbH (Potsdam, Deutschland) vorgenommen. Die Immunisierung des adulten, männlichen Tieres wurde nach dem in Tabelle 18 und Tabelle 19 beschriebenen Ablauf durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Injektionen mit Antigen appliziert, wobei für die erste ein Mix aus 50 % inkomplettes Freund's Adjuvans und 50 % komplettes Freund's Adjuvans verwendet wurde, für die restlichen Injektionen jedoch ausschließlich inkomplettes Freund's Adjuvans.

---

#### 3.6.2 Blutentnahme bei *Lama glama*

---

Für die Entnahme von Lama-Vollblut zur Generierung der naiven VHH-Bibliothek, wurden aus einer Herde des Versuchsguts Relliehausen der Georg-August-Universität Göttingen 12 adulte Tiere beider Geschlechter willkürlich ausgewählt. Je etwa 90 ml Vollblut wurden in dafür vorbereitete K-EDTA-Blutröhrchen entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Halsvene in Höhe zwischen 5. und 6. Halswirbel. Die Tiere wurden für die Dauer der Blutentnahme mit schwenkbaren Gatter-Elementen vorsorglich leicht fixiert. Die Proben wurden bei etwa 4-8 °C bis zur weiteren Verarbeitung (etwa 6 Std) gelagert.

Die Blut- und Plasma-Entnahme bei dem immunisierten Lama (Name: „Masko“) wurde komplett durch die Fa. Preclinics (Potsdam, Deutschland) vorgenommen. Die Vollblut-Proben wurden dabei in zwei verschiedenen Ausführungen nach Entnahme behandelt. Ein Teil wurde direkt nach Entnahme in *PAXgene® Blood RNA tubes* (Preanalytix, Heidelberg) gegeben. Der andere Teil wurde in einer Glasflasche mit 10 % (v/v) Heparin und 10 % (v/v) Pen/Strep-Lösung gegeben und durchmischt. Das Serum wurde vollständig mit 10 % (v/v) Heparin und 10 % (v/v) Pen/Strep-Lösung vermengt. Der Transport erfolgte jeweils bei etwa 4-8 °C.

### 3.6.3 Isolierung von Lymphozyten mittels Ficoll-Gradienten-Zentrifugation

Um aus Vollblut eine Lymphozyten-reiche Zelllösung zu isolieren, kann man sich der Gradientenzentrifugation mittels Ficoll-Lösung bedienen (Abbildung 17). Ficoll ist ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, das gut in Wasser löslich ist. Diese Methode basiert darauf, dass die Dichte der verwendeten Ficoll-Lösung (1,077 g/ml) niedriger ist als die Dichte von Erythrozyten und Granulozyten aber höher als die von Monozyten und Lymphozyten.

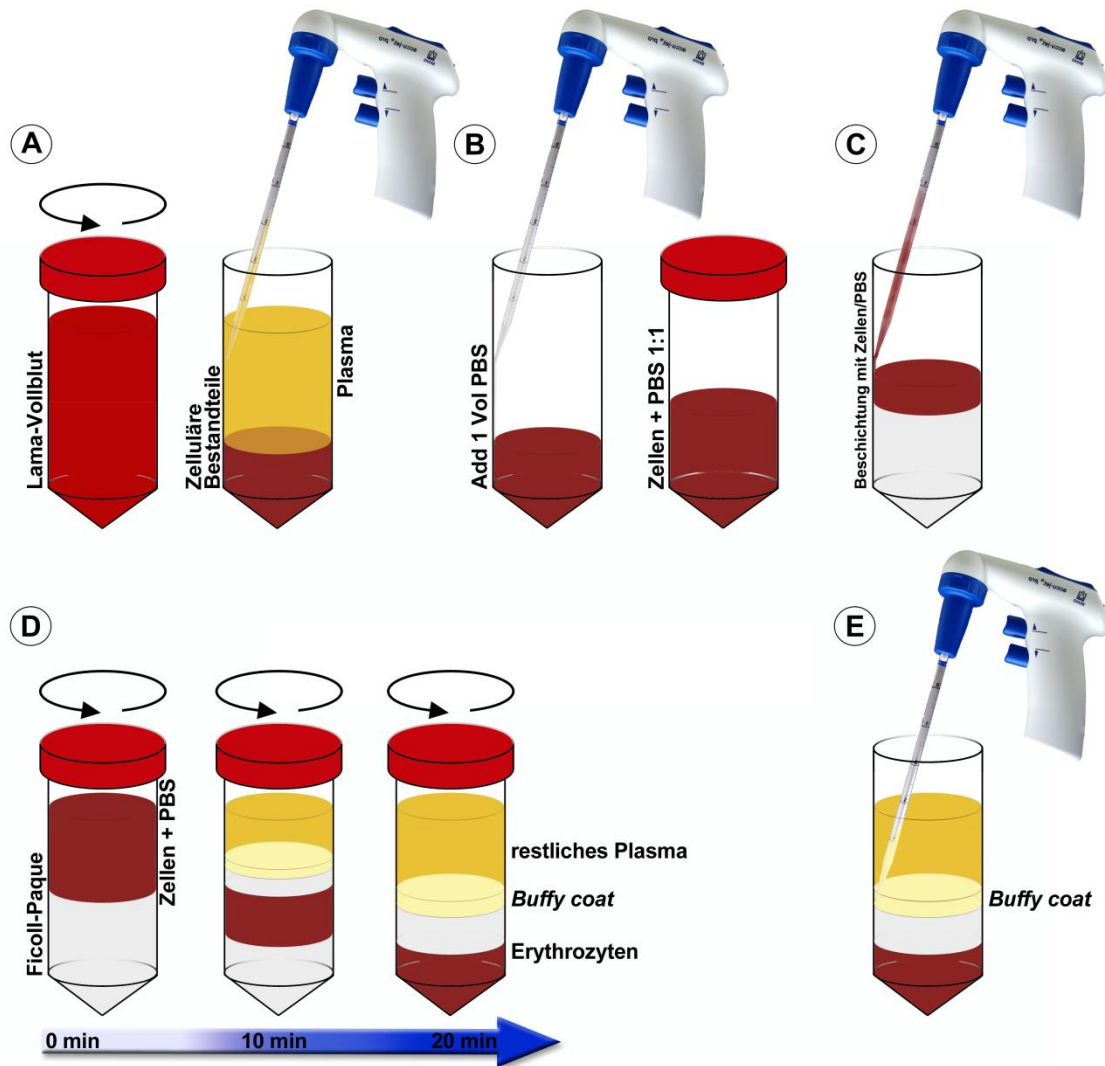


Abbildung 17: Durchführung eines Ficoll-Gradienten zur Isolierung der Lymphozyten aus Vollblut. (A) Zunächst wurde das Vollblut durch Zentrifugation in Plasma sowie Blutzellbestandteile getrennt und das Plasma verworfen. (B) Die Zellen wurden durch Zugabe von etwa einem Volumen PBS verdünnt. (C) In einem neuen Zentrifugenröhrchen wurden 25 ml Ficoll-Lösung vorgelegt und das Zell-PBS-Gemisch vorsichtig auf die Ficoll-Lösung pipettiert. (D) Durch Zentrifugation kam es zur Trennung der einzelnen Blutbestandteile. Die gelblichen Plasma-Reste bildeten zusammen mit den Thrombozyten die oberste Phase. Darunter, und zugleich oberhalb der Ficoll-Lösung, bildete sich die Interphase (*buffy coat*). Unterhalb der Ficoll-Lösung waren Erythrozyten und Granulozyten lokalisiert. (E) Die Interphase wurde anschließend mit einer Glaspipette abgenommen.



Das mit EDTA-Lösung versetzte Vollblut wurde zunächst durch Zentrifugation bei 1.500 U/min und 25 °C für 15 min so gut wie möglich in Plasma und Blutzellbestandteile getrennt (Abbildung 17 A). Anschließend wurden die Blutzellbestandteile 1:1 mit PBS gemischt (Abbildung 17 B) und vorsichtig in einem neuen 50 ml Zentrifugen Röhrchen auf eine Schicht von 25 ml Ficoll-Lösung pipettiert (Abbildung 17 C). Die Proben wurden dann für 30 min bei 1.000 g zentrifugiert, wobei die Rotorbremse deaktiviert wurde, um den Gradienten intakt zu halten (Abbildung 17 D). Durch die Zentrifugation bildet sich über der Ficoll-Lösung eine dünne Bande mit mononukleären Zellen (*buffy coat*). Im *buffy coat* befinden sich etwa 90 % Lymphozyten sowie 10 % Monozyten. Am Grund des Zentrifugenröhrchens setzen sich dagegen andere Zellen wie Erythrozyten und Granulozyten ab. Über der Lymphozytenschicht verbleibt eine gelbliche Phase bestehend aus Plasma und Thrombozyten (Abbildung 17 D).

Die weiße Interphase (*buffy coat*) wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (Abbildung 17 E). Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und die Zellen gewaschen (10 min, 1.500 U/min, RT), um Ficoll-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen wieder in 50 ml PBS gelöst und die Zellmenge durch ein CASY® TT bestimmt (Tabelle 6; 3.6.4). Die Zellen wurden daraufhin erneut pelletiert sowie final in 1-2 ml PBS aufgenommen und entweder sofort die RNA extrahiert oder vor der weiteren Verarbeitung zunächst bei -120 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

---

#### 3.6.4 Zellzahlbestimmung mit einem CASY®-Analysegerät

---

Die Bestimmung der Zellzahl mit einem CASY® TT basiert auf der elektronischen Erfassung der Zellen beim Passieren einer Messpore. Das generierte Signal, die *Electrical Current Exclusion* (ECE®), ist abhängig von der Zellvitalität und einer intakten Zellmembran. Eine Zelle, deren Zellmembran vollständig intakt ist, schließt den elektrischen Strom beim Durchtritt durch die Messpore aus und erzeugt ein Signal abhängig vom Volumen der Zelle (ECE®). Tote Zellen mit beschädigter Zellmembran können den Strom nicht mehr ausschließen und erzeugen ein Signal entsprechend dem Signal ihres Zellkerns. Die CASY®-Pulsflächenanalyse ermöglicht eine digitale Signalauswertung von 10<sup>6</sup>/sec und bietet somit eine hohe Auflösung zur Abdeckung eines großen Messbereichs. Die Messung wurde mit einem Kapillardurchmesser von 150 µm und einem Probenvolumen von 10 µl durchgeführt.

---

#### 3.6.5 RNA-Extraktion aus dem Vollblut von *Lama glama*

---

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Vollblut von Lamas wurden verschiedene Strategien verfolgt. Für die zu Beginn dieser Arbeit generierte naive Lama-VHH-Bibliothek wurden nach der Blutentnahme und Aufnahme in EDTA-Lösung (3.6.2) zunächst durch Ficoll-Gradienten-Zentrifugation die Lymphozyten aus dem Vollblut isoliert (3.6.3). Die anschließende RNA-Extraktion aus den Lymphozyten erfolgte durch das *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen, Life Technologies Corp.). Die Isolierung wurde nach Vorgaben des Herstellers mit 5x10<sup>7</sup> Lympho-

zyten je Extraktion und unter vorheriger Verwendung eines *Homogenizers* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) durchgeführt.

Für die RNA-Extraktion aus dem Vollblut des immunisierten Lamas (Name: „Masko“) wurde ein Teil des Blutes direkt nach Entnahme in *PAXgene® Blood RNA tubes* (Preanalytix, Heidelberg) transferiert. Diese Proben wurden mit dem *PAXgene® Blood miRNA Kit* nach Herstellerangaben weiter bearbeitet und so die komplette RNA extrahiert. Der restliche Teil des Blutes wurde für die Extraktion der RNA mit TRI Reagent BD® (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA) behandelt. TRI Reagent BD® besteht aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol, welche Protein-denaturierende Eigenschaften besitzen und dadurch RNasen inhibieren. Durch Zugabe von 1-Brom-3-Chloroform entstehen nach Durchmischen der Lösung drei Phasen. Die obere, wässrige RNA-haltige Phase, die DNA-haltige Intermediärphase und die untere, organische Protein-haltige Phase.

800 µl TRI Reagent BD® wurden mit 20 µl [5 M] Essigsäure gemischt und 200 µl Vollblut hinzugegeben. Die Probe wurde durch invertieren gemischt und einige min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µl 1-Brom-3-Chloroform hinzugegeben, kurz durch vortexen gemischt und erneut für 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Nach 10-15 min Inkubation bei RT wurde erneut für 15 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser aufgenommen und entweder direkt eingesetzt oder bei -20 °C für maximal eine Woche gelagert. Für eine dauerhafte Lagerung wurde die RNA-Lösung mit 1 Vol Isopropanol gemischt, dadurch gefällt, und anschließend ebenfalls bei -20 °C gelagert.

---

### 3.6.6 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

---

Für die Transkription von RNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase *SuperScript® III* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) verwendet. Für eine Reaktion wurden 0,1-1 µg RNA sowie Oligo(dT)<sub>20</sub>- oder *Random Hexamer Primer* eingesetzt. Die einzelnen Komponenten für die Transkriptionsreaktion wurden vor Gebrauch gut durchmischt. Zunächst wurden RNA, dNTP Mix und Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 10 µl (0,1-1 µg RNA, 1mM dNTP Mix, 5 µM Oligo(dT)<sub>20</sub> oder 50 ng/µl *Random Hexamer Primer* sowie DEPC behandeltes Wasser) bei 65 °C für 5 min inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen und die Nukleinsäuren zu denaturieren. Danach wurde der Ansatz für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Nach Zuführung von 10 µl cDNA Synthese Mix (2 µl RT Puffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02 M DTT, 40 U RNaseOUT™ und 200 U *SuperScript® III* RT) erfolgte die Synthese. Der Gesamtansatz wurde hierfür für 50 min bei 50 °C inkubiert. Bei der Verwendung von *Random Hexamer Primer* wurde zuvor ein zusätzlicher Schritt für 10 min bei 25 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion bei 85 °C für 5 min terminiert und danach auf Eis gelagert. Der Reaktionsmix



wurde kurz zentrifugiert, um kondensiertes Wasser zurückzuführen, und 2 U RNase H hinzugefügt. Der Verdau der RNA, zur Entfernung aus dem Ansatz, erfolgte bei 37 °C für 20 min. Die transkribierte cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt für eine PCR eingesetzt.

---

### 3.7 Methoden zur Generierung von VHH-Bibliotheken

---

#### 3.7.1 Transformation von *Escherichia coli* ER2738 zur Generierung von *phagemid* Bibliotheken

---

Für die Generierung einer *phagemid* Bibliothek wurden zunächst ultrakompetente *E. coli* ER 2738-Zellen hergestellt. Hierfür wurde SOB-Medium (2.9.1) mit 12,5 µg/l Tetracyclin versetzt und mit ER2738 Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Das Kulturvolumen wurde auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt, bei 4.000 U/min für 10 min pelletiert und dreimal mit eiskaltem destilliertem Wasser (50 ml, 30 ml, 10 ml) gewaschen, wobei nach jeder Resuspendierung eine einstündige Inkubationszeit auf Eis erfolgte. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und mit dem Restwasser im Zentrifugenröhrchen gelöst.

Zu jeder der Zellsuspensionen wurden 15 µl des gereinigten Ligationsansatzes gegeben, das Gemisch kurz auf Eis inkubiert und eine Elektroporation nach folgenden Angaben durchgeführt: 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6,25 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0-4,5 ms Zeitkonstante. Nach der Transformation wurden die Transformationsküvetten jeweils dreimal mit 800 µl SOC-Medium (2.9.1) gespült und in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspensionen wurden für 1 Std bei 37 °C und 180 U/min (Schüttelinkubator) inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml Zellsuspension auf dYT-Agarplatten (150x20 mm), die zur Selektion mit 12,5 µg/l Tetracyclin und 25 µg/l Chloramphenicol versetzt waren, ausgebracht und für etwa 20 Std bei 37 °C inkubiert. In gleicher Weise wurden Verdünnungsplatten zur Bestimmung der Kolonienzahl hergestellt und inkubiert. Die Verdünnungen wurden zuvor in dYT-Medium zu Dilution von 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> und 10<sup>-8</sup> hergestellt.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Agarplatten mit je 3 ml dYT-Medium abgeschwemmt und vereinigt. Zusätzlich wurde der Zellsuspension 10 % (v/v) DMSO hinzugefügt, diese gründlich durchmischt und zu Aliquots von etwa 1,8 ml bei -80 °C eingefroren. Die Analyse der Transformationseffizienz erfolgte anhand der Verdünnungsplattierungen, deren Platten mit einer zählbaren Anzahl an Kolonien bewachsen waren.

---

#### 3.7.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mittels Elektroporation

---

Für die Transformation von Hefezellen wurden zwei Strategien angewendet. Bei Standardtransformationen für Klonierungen oder Erzeugung von Einzelklonen wurde das Proto-

koll nach Chao *et al.* verwendet <sup>[147]</sup>. Hierfür wurden zunächst EBY100 Zellen in 5 ml YPD-Medium über Nacht kultiviert (30 °C und 200 U/min) und anschließend 50 ml YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert. Es wurde erneut bis zu einer OD<sub>600</sub>=1,5 kultiviert, 500 µl Tris-DTT Puffer (Tabelle 7) hinzugefügt sowie weitere 15 min bei 30 °C und 200 U/min inkubiert. Die Hefezellen wurden anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert (5 min, 3.000 U/min, 4 °C, Heraeus Multifuge 3L-R) und zweimal mit eiskaltem Puffer E1 (25 ml und 1 ml; Tabelle 7) gewaschen. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Das Pellet wurde final in 300 µl eiskaltem Puffer E1 aufgenommen. Je Transformation wurden 100 µl Suspension mit 500 ng zirkulärem Vektor oder 1 µg linearisiertem Vektor und 5 µg *Insert*-DNA eingesetzt. Zellen und DNA wurden vor der Transformation für 3-5 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde in gekühlten 2 mm Elektroporationsküvetten im Gene Pulser (BioRad) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF mit Pulsregler durchgeführt. Jede Elektroporationsküvette wurde anschließend sofort zweimal mit 1 ml YPD Medium gespült und jede Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt sowie für 1 Std inkubiert (30 °C und 200 U/min). Zum Schluss wurden die Zellen pelletiert und zur Selektion in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) aufgenommen. Je nach Bedarf wurden Zellen auf SD(-Trp)-Agar (2.9.2) ausgebracht oder in SD(-Trp)-Medium kultiviert (2.9.2).

Zur Generierung von Transformanden in quantitativen Mengen, z. B. bei der Herstellung von Antikörper-Bibliotheken, wurde das Protokoll nach Benatuil *et al.* verwendet <sup>[178]</sup>. Hierfür wurden ebenfalls zunächst EBY100 Zellen in 5 ml YPD-Medium über Nacht (30 °C und 200 U/min) bis zur stationären Phase (OD<sub>600</sub> = ~3) kultiviert und damit anschließend 100 ml frisches YPD-Medium beimpft (OD<sub>600</sub> = 0,3). Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,6 weiter kultiviert (30 °C und 200 U/min) und anschließend pelletiert (3.000 U/min, 3 min, Heraeus Multifuge 3L-R). Danach wurde das Pellet zweimal mit 50 ml eiskaltem Aqua bidest. und einmal mit 50 ml eiskaltem Elektroporationspuffer (Tabelle 7) gewaschen. Die Hefezellen wurden erneut pelletiert, in 20 ml LiAc/DTT (Tabelle 7) aufgenommen und für 30 min bei 30 °C und 200 U/min kultiviert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, einmal mit 50 ml eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen und final in etwa 200 µl Elektroporationspuffer aufgenommen, um ein Gesamtvolumen von etwa 1 ml zu erreichen. Je Transformation wurden hiervon etwa 400 µl eingesetzt, dies entsprach in etwa einer Zellzahl von  $1,6 \times 10^9$ . Die Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis gelagert. Für die Transformation wurden die 400 µl Zellsuspension mit 2-4 µg linearisierter Vektor-DNA sowie 6-12 µg *Insert*-DNA im Verhältnis 1:3 und einem Maximalvolumen von 50 µl gemischt, vorsichtig durchmischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen mit 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF mit *pulse controller (gene pulser Xcell™ PC modul, BioRad)* im Elektroporator (*gene pulser Xcell™*, BioRad) elektroporiert. Anschließend wurden die Hefezellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit 8 ml YPD-Medium (+ 1M Sorbitol) überführt, die Küvette dabei sorgfältig ausgespült, und für 1 Std (30 °C und 200 U/min) inkubiert. Danach wurden die Hefezellen wieder pelletiert, in 125 ml SD(-Trp)-Medium (2.9.2) je Transformationsansatz aufgenommen und über Nacht bei 30 °C und 200 U/min kultiviert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz, wurden außerdem Verdünnungsplattierungen auf

SD(-Trp)-Agar (2.9.2) generiert, die nach etwa 72 Std bei 30 °C im Inkubator ausgewertet werden konnten.

### 3.8 Durchflusszytometrische Arbeitsmethoden

#### 3.8.1 Immunfluoreszenz-Markierung von *Saccharomyces cerevisiae* (EBY100)

Um Hefezellen (*S. cerevisiae*) für die Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie zu präparieren, wurden diese mit einem Fluoreszenzmarker immunchemisch gefärbt. Nach Induktion der Hefezellen in SG-Medium (2.9.2) und Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ), wurde je nach Anwendung eine definierte Zellzahl für die Markierung eingesetzt. Eine  $OD_{600}$  von 1 entsprach hierbei einer Zellzahl von  $10^7$  Hefezellen pro ml <sup>[147]</sup>.

Für die Bestimmung der Induktion wurden  $10^6$ - $10^7$  Hefezellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei etwa 10.000 U/min für 2 min pelletiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 20  $\mu$ l Anti-Myc-Antikörper-Lösung (1:5 Anti-Myc-Antikörper (AK Friedel, TU Darmstadt) in PBS) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und für 10 min in 20  $\mu$ l Sekundär-Antikörper-Lösung (0,1 mg/ml Anti-Maus-Biotin-Konjugat in PBS) auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 500  $\mu$ l PBS wurden die Zellen in 20  $\mu$ l SAPE-Färbelösung (0,01 mg/ml SAPE in PBS) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift mit 500  $\mu$ l PBS wurden die Zellen in PBS aufgenommen und fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Markierung von Hefezellen mit Zielprotein für Sortierungen wurden  $10^7$ - $10^9$  Zellen, für Einzelklon-Markierungen  $10^6$  Zellen eingesetzt. An Zielprotein wurden je nach Situation Konzentrationen im Bereich von 1-1.000 nM verwendet. Die genauen Parameter sind in den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 4) aufgeführt. Für die Fluoreszenz-Markierung des Zielproteins wurden zwei Strategien verwendet. Beinhaltete die Sequenz des Zielproteins ein His-Tag Epitop, so wurde die Markierung mit einer Antikörper-Lösung (10  $\mu$ g/ml Penta-His-AlexaFluor488-Konjugat in PBS) für 10-20 min auf Eis durchgeführt. Die zweite Möglichkeit bestand in der vorherigen Biotinylierung (3.5.7) des Zielproteins und der Markierung durch eine SAPE-Lösung (10-100  $\mu$ g/ml SAPE in PBS) für 10 min auf Eis. Bei beiden Markierungsstrategien wurde anschließend mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen.

#### 3.8.2 Durchflusszytometrie mit *Saccharomyces cerevisiae* unter Verwendung eines MoFlo-Sortiergerätes

Die Durchmusterungen nach geeigneten Hefeklonen mit den gewünschten Bindeeigenschaften wurden am MoFlo-Sortiergerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) der Fa. Beckman-Coulter durchgeführt. Als Laufpuffer wurde autoklaviertes und sterilfiltriertes PBS verwendet. Der laseroptische Strahlengang wurde mithilfe fluoreszierender MicroBeads (Polystyrenpartikel, Beckman Coulter) justiert. Die *photomultiplier* wurden standardmäßig auf die Werte 650

(*site scatter*), 600 (FL1: Alexafluor488-Fluoreszenz) und 600 (FL2: R-Phycoerythrin-Fluoreszenz) eingestellt. Gemessen wurde im *log mode* mit einer Ereignisfrequenz von i. d. R. maximal 10.000-20.000 Events/Sekunde. Die Online-Analyse und anschließende Auswertung der Daten wurden mit der Software Summit v4.0 bzw. Summit v4.3 durchgeführt. Sortiert wurde in den Modi *sort-enrich3* oder *sort-single1*.

Bei einer Hefezell-Sortierung wurde im Anschluss der Sortierung in den meisten Fällen sofort eine Rücksortierung durchgeführt, um die Anreicherung noch zu steigern. Dabei wurde das Sortierungsfenster bei Bedarf stringenter gelegt, als bei der vorherigen Sortierung. Nach Abschluss der Durchmusterung wurden die Hefezellen sofort in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) überführt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von mindestens 0,5 bei 200 U/min und 30 °C im Schüttler inkubiert (i. d. R. 48 Std).

---

### 3.8.3 Durchflusszytometrie mit *Saccharomyces cerevisiae* unter Verwendung eines INFLUX Sortiergerätes

---

Mit dem INFLUX Sortiergerät der Fa. Becton-Dickinson GmbH wurde eine Sortierung mit Hefezellen durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde in gleicher Weise durchgeführt, wie bei Sortierungen mit dem MoFlo Sortiergerät der Fa. Beckman-Coulter (3.8.2).

---

### 3.8.4 Analytische Durchflusszytometrie mit *Saccharomyces cerevisiae* am Accuri® C6 Flow Cytometer

---

Für analytische Messungen von fluoreszenzmarkierten Hefezellen, wie beispielsweise Affinitäts-Titrationsen, wurde der Accuri® C6 Flow Cytometer der Fa. Becton-Dickinson verwendet. Auch hier wurden die zu analysierenden Hefezellen wie unter 3.8.1 beschrieben fluoreszenzmarkiert. Gemessen wurde mit den Einstellungen für *threshold* von 80.000 FSC (*forward scatter*), einer *Medium Flow Rate* und einem Event-Limit von i. d. R. 20.000-50.000 Hefezellen.

---

### 3.8.5 Magnetische Sortierung (MACS) zur Abreicherung von unerwünschten Zellpopulationen

---

Um eine Anreicherung von unerwünschten Bindern gegen sekundäre Moleküle zur Fluoreszenzmarkierung bei der Durchmusterung zu vermeiden, wurden Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen, Life Technologies Corp.) eingesetzt. Die einheitliche und einschichtige Beladung der *dynabeads* mit Streptavidin wurde genutzt, um Streptavidin bindende Hefezellen in der Bibliothek abzureichern. Mithilfe ihrer magnetischen Eigenschaften wurden die Dynabeads zusammen mit den gebundenen Hefezellen aus der Suspension entfernt und anschließend eine Standard-Antigenmarkierung der übrigen Hefezellen durchgeführt.

Die zu durchmusternden Hefezellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Genexpression (3.2.2) pelletiert und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Hefezellen wieder in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen, gut resuspendiert und 15  $\mu$ l *dynabeads* hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend bei RT für 45 min invertiert. Um die *dynabeads* sowie die daran gebundenen Hefezellen aus dem Gemisch zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gebracht, 30 sek dort verwahrt und die Suspension ohne die an der Gefäßwand lokalisierten *dynabeads* in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um restliche *dynabeads* zu entfernen. Die abgereicherte Hefesuspension wurde anschließend in 500 ml PBS aufgenommen und es wurde mit der eigentlichen Immunmarkierung (3.8.1) für die Durchmusterung im FACS (3.8.2, 3.8.3) begonnen.



---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---



---

### 4.1 Erstellung und Durchmusterung einer naiven VHH-Bibliothek aus *Lama glama*

---

Im Folgenden wird die Herstellung einer naiven VHH-Bibliothek in zwei Formaten, als *phagemid* sowie Hefe-Bibliothek, beschrieben. Dabei wird auf das Konzept und die Beschaffung des Vollbluts sowie die molekularbiologischen Arbeiten zur Generierung des VHH-Repertoires eingegangen.

---

#### 4.1.1 Konzept zur Gewinnung des naiven VHH-Repertoires

---

Für die Generierung einer VHH-Antikörperfragment-Bibliothek aus dem naiven Repertoire von Lamas (*Lama glama*), wurde auf die genetische Ribonukleinsäure-Information der im Blut enthaltenen B-Lymphozyten zugegriffen. Wie unter 1.1 beschrieben, sind die B-Lymphozyten Teil des humoralen Immunsystems und somit der Antikörper vermittelten Immunität der Wirbeltiere. Sie exponieren das gesamte Antikörper-Repertoire des Immunsystems auf ihrer Zelloberfläche, wobei jede B-Zelle nur einen spezifischen Antikörper exprimiert und die genetische Information für diesen enthält. Da die tatsächliche Antikörper-Diversität durch die somatische VDJ-Rekombination entsteht, musste die mRNA als Matrize herangezogen werden, weil auf dieser Ebene der Expression alle *splicing*- und Rekombinations-Prozesse abgeschlossen sind <sup>[54]</sup>. B-Zellen gehören zum Zellbestandteil des Blutes, weshalb zunächst eine gewisse Menge Lama-Vollblut gesammelt werden musste. Um eine möglichst große genetische Diversität zu erhalten, wurden hierfür 12 Tiere als Spender herangezogen (Abbildung 18). Die Lymphozyten (*buffy coat*) wurden nach Blutentnahme über einen Ficoll-Gradienten (3.6.3) isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert (3.6.5). Um die genetische Information für die VHH-Fragmente aus der Gesamt-RNA amplifizieren zu können, wurde diese zunächst in cDNA transkribiert (3.6.6). Die VHH-Sequenzen wurden anschließend über mehrere PCR Schritte amplifiziert und für die Klonierung in den jeweiligen Zielvektor modifiziert. Für diese Arbeit wurden zwei Strategien der Oberflächenpräsentation verfolgt. Zum einen wurde die klassische Präsentation auf dem Hüllprotein pIII der M13-Phagen <sup>[124]</sup> und zum anderen die Oberflächenpräsentation nach Wittrup *et al.* <sup>[126], [127]</sup> auf der Oberfläche von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt (Abbildung 18).



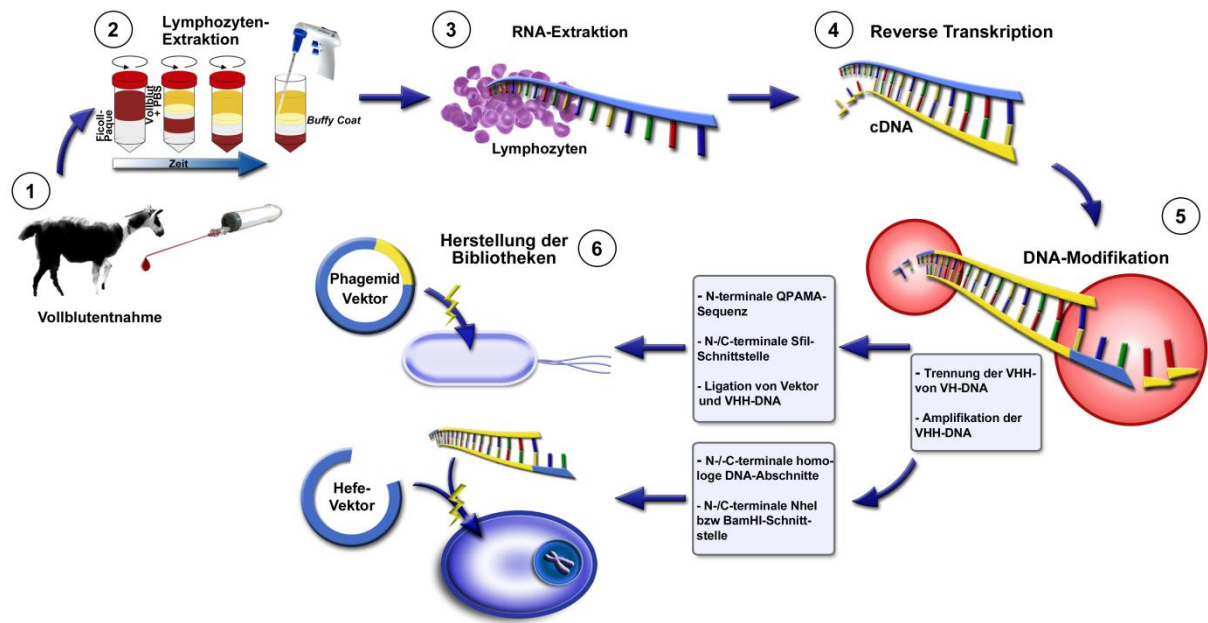


Abbildung 18: Konzept zur Generierung einer VHH-Bibliothek in Phagen und Hefen für die Nutzung zur Durchmusterung durch Oberflächenpräsentation. (1) Vollblutentnahme bei 12 adulten Lamas. (2) Isolierung und Reinigung der Lymphozyten (*buffy coat*) aus dem Vollblut. (3) Extraktion der RNA aus den Lymphozyten. (4) Reverse Transkription der Gesamt-RNA in cDNA. (5) Trennung der VHH-DNA von VH-DNA und Amplifikation der VHH-DNA. Anschließend individuelle Modifikation der VHH-DNA in mehreren Schritten zur Anpassung an die Zielvektoren (*phagemid* bzw. *Hefe-Vektoren*). (6) Herstellung der Bibliotheken im Phagen bzw. Hefe-Format durch Elektroporation.

#### 4.1.2 Probenentnahme und Generierung der cDNA

Die Entnahme der Probe wurde auf dem Versuchsgut Relliehausen der Universität Göttingen durchgeführt. Um eine ausreichende Menge Vollblut zu erhalten, wurden insgesamt 12 adulte Tiere weiblichen sowie männlichen Geschlechts für die Blutentnahme herangezogen (Abbildung 19).



Abbildung 19: Teil der Lama-Herde des Versuchsguts Relliehausen, die als Spender zur Entnahme von Vollblut herangezogen wurden.



Die Tiere wurden nacheinander wie unter 3.6.2 beschrieben fixiert und die Halsvene unterhalb des 5. Halswirbels punktiert. Es wurden jeweils etwa 90 ml Vollblut entnommen (1080 ml Gesamtvolumen), in die dafür vorbereiteten EDTA-Blutentnahme-Röhrchen transferiert und bei etwa 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Dabei wurde strikt darauf geachtet, dass das Blut nicht gefriert. Nach dem Probentransport wurde das Blut zeitnah weiterverarbeitet. Im nächsten Schritt wurden die Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten (3.6.3) in der Zentrifuge von den restlichen Blutbestandteilen getrennt (Abbildung 20 A). Ziel war es hierbei, die Lymphozyten so weit wie möglich zu isolieren, da deren RNA für die cDNA-Transkription benötigt wurde. Der *buffy coat* (Lymphozyten-reiche Interphase im Ficoll-Gradienten) wurde nach der Auftrennung im Gradienten mit einer Glaspipette abgenommen und mit 50 ml PBS gewaschen (Abbildung 20 B). Dies wurde mit dem gesamten Probenvolumen durchgeführt und die Lymphozyten anschließend vereint, durchmischt und die Zellzahl mit einem CASY<sup>®</sup> Analysegerät bestimmt (3.6.4). Insgesamt konnten aus 1080 ml Vollblut etwa  $7,2 \times 10^8$  Lymphozyten isoliert werden, die zu je 1,5 ml mit einer Konzentration von  $3,2 \times 10^7$  Zellen/ml aliquotiert wurden und entweder bei – 120 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort weiterverarbeitet wurden.

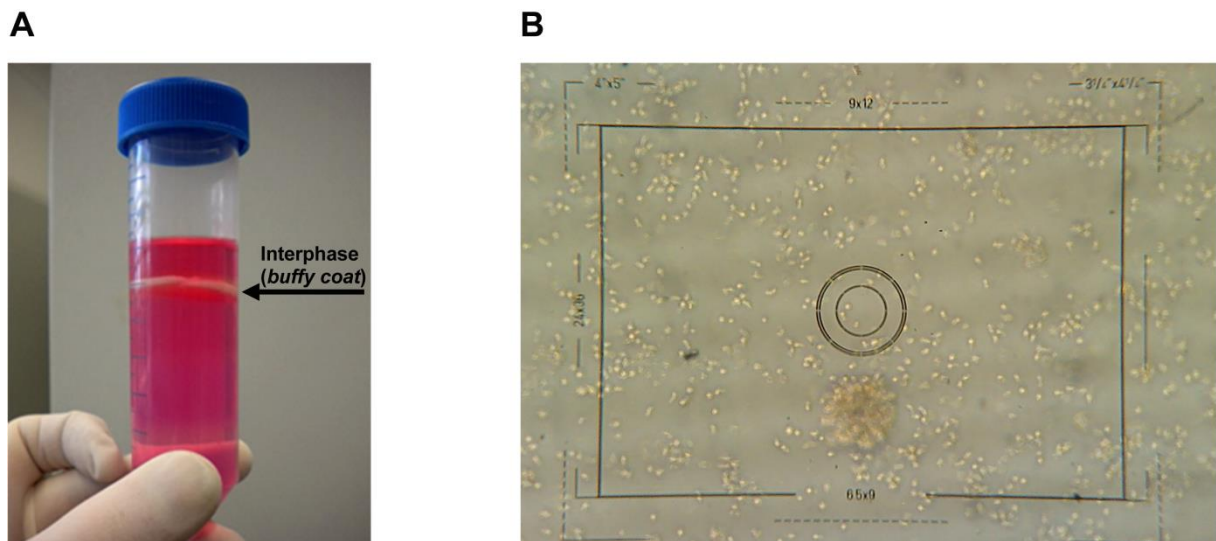


Abbildung 20: (A) Auftrennung von verdünntem Vollblut (1:1 mit PBS) in einem Ficoll-Gradient. Die Interphase (*buffy coat*) ist seitlich mit einem schwarzen Pfeil markiert. (B) Mikroskopische Aufnahme der durch den Ficoll-Gradienten isolierten und gewaschenen Lymphozyten aus dem Vollblut von Lamas.

Im nächsten Schritt wurde die Gesamt-RNA extrahiert, wofür das *PureLink<sup>®</sup> Total RNA Blood Kit* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) eingesetzt wurde. Etwa  $5 \times 10^7$  Lymphozyten wurden für jede einzelne Extraktion eingesetzt und zuvor über einen Homogenisator homogenisiert. Die RNA wurde nach Angaben des Herstellers extrahiert. Nach der Extraktion wurden stichprobenartig einige Ansätze durch eine Gelelektrophorese darauf überprüft, ob die isolierte RNA intakt war. Ein Indikator hierfür sind die beiden Banden der 18 S und 28 S rRNA (ribosomale RNA). 5  $\mu$ l Probenvolumen der RNA-Extrakte wurden mit Auftragspuffer versetzt und

für 2 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen und intermolekulare Wechselwirkungen zu denaturieren. Die Proben wurden anschließend über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt, wobei zur Orientierung ein Lambda DNA Marker verwendet wurde (vergleiche Abbildung 21 A). Das Gel zeigte in allen fünf Spuren zwei Banden. Die obere Bande wurde hier der 28 S rRNA, die untere Bande der 18 S rRNA zugeordnet. Die restliche Gesamt-RNA wurde entweder bei -20 °C eingefroren oder gleich weiterverarbeitet. Hierfür wurde sie mittels reverser Transkriptase *SuperScript®III* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) in cDNA (*complementary DNA*) transkribiert. Die Transkription erfolgte nach Angaben in 3.6.6 mit einer eingesetzten Menge RNA von 0,1-1 µg je Ansatz sowie Oligo(dT)<sub>20</sub>- oder *random hexamer primer* (Tabelle 3). Nach der cDNA-Synthese erfolgte die Degradierung der RNA mittels RNaseH.

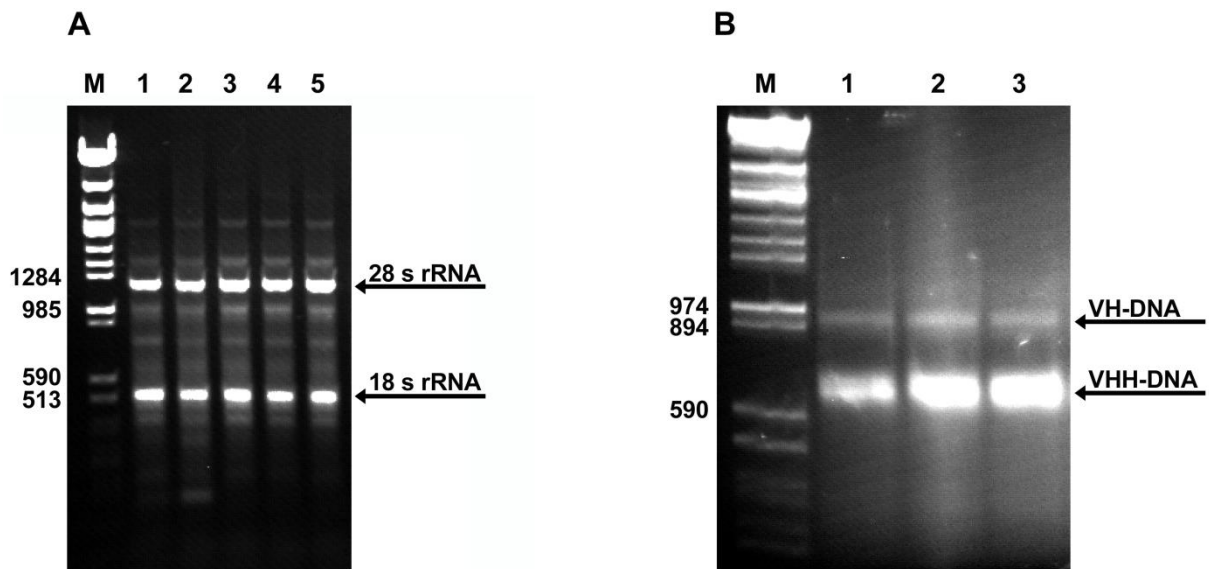


Abbildung 21: Analyse der Gesamt-RNA-Extrakte. Fünf Gesamt-RNA Proben (Spur 1-5, A) wurden über eine 1 % (w/v) Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden, welche der 28 und 18 S rRNA zugeordnet wurden, sind seitlich mit schwarzen Pfeilen markiert (A). Beispiel einer gelelektrophoretischen Analyse der ersten PCR-Reaktion (PCR#1) zur Amplifikation der DNA der schweren Antikörperketten von der Signalsequenz bis zur CH2-Region. Die VHH-DNA (untere Banden bei etwa 600 bp der Spuren 1-3, B) wurde aus dem Gelextrahiert. Die VH-DNA (obere Banden bei etwa 850 bp der Spuren 1-3, B) wurde verworfen. M: *Lambda DNA/Eco47I (AvaII)*, 13 Marker.

Die generierte cDNA wurde anschließend direkt, ohne zusätzliche Reinigungsschritte, in einer weiteren PCR eingesetzt. Im ersten PCR-Schritt wurden die variablen Domänen der schweren Antikörper-Ketten amplifiziert. Die Oligonukleotide (LVHH-PCR1\_up und LVHH-PCR1\_lo; Tabelle 3) wurden so gewählt, dass die Gensequenz beginnend mit dem N-Terminus bis hin zur CH2 Domäne amplifiziert wurde <sup>[198]</sup>. Je PCR-Reaktion (3.4.3) wurden 3 µl cDNA-Gemisch verwendet. Da die VHH enthaltenden Schwerekettenantikörper im Gegensatz zur schweren Kette der konventionellen Antikörper keine CH1 Domäne aufweisen, sind die durch diese PCR entstehenden Amplifikate unterschiedlich lang. Die VHH-Amplifikate laufen in der Elektrophorese schneller durch das Agarosegel und liegen etwa in Höhe von 600 bp. Die Amp-

lifikate der konventionellen Antikörper laufen dagegen in einer Höhe von etwa 850 bp. Nach elektrophoretischer Auftrennung (3.3.5) mit einem 2 % (w/v) Agarosegel wurden die unterschiedlichen Amplifikate getrennt. Abbildung 21 B zeigt beispielhaft eine DNA-Auftrennung vor der Extraktion. In den drei Spuren sind deutlich die beiden unterschiedlichen Amplifikate erkennbar. Die untere der beiden Banden (VHH-Amplifikat) wurde extrahiert (3.3.6) und nach Reinigung für eine weitere PCR-Reaktion (PCR#2) eingesetzt, in der nur die VHH-Domänen von den Matrizen amplifiziert sowie beidseitige Modifikationen für spätere Klonierungsschritte angehängt wurden. Je nach Ziel-Vektor und Oberflächenpräsentationsformat wurden bestimmte Oligonukleotide sowie unterschiedliche Klonierungsstrategien eingesetzt (Abbildung 18). Im Folgenden wird beschrieben, wie, ausgehend von dem in PCR#1 generierten Amplifikat, DNA für eine Phagen- sowie eine Hefe-Bibliothek generiert wurde.

### 4.1.3 Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek im Phagen-Format

Zur Generierung der VHH-Bibliothek im Phagen-Format wurden VHH- und Vektor-DNA für eine anschließende Ligation mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I verdaut. Die VHH-DNA wurde dafür in einer dreistufigen PCR hergestellt. Die erste PCR (PCR#1) ist unter 4.1.2 beschrieben und beinhaltet die Amplifikation der VH- sowie VHH-DNA, beginnend mit der Signalsequenz bis zur CH2-Region, unter Verwendung des Gesamt-RNA-Pools als Matrize (Abbildung 22) sowie die anschließende Extraktion der VHH-DNA aus einem Agarosegel (Abbildung 21). PCR-Schritt zwei (PCR#2) dient der Amplifikation der VHH-DNA sowie der N- sowie C-terminalen Addition einer unvollständigen *Sfi*I-Schnittstelle (Abbildung 22).

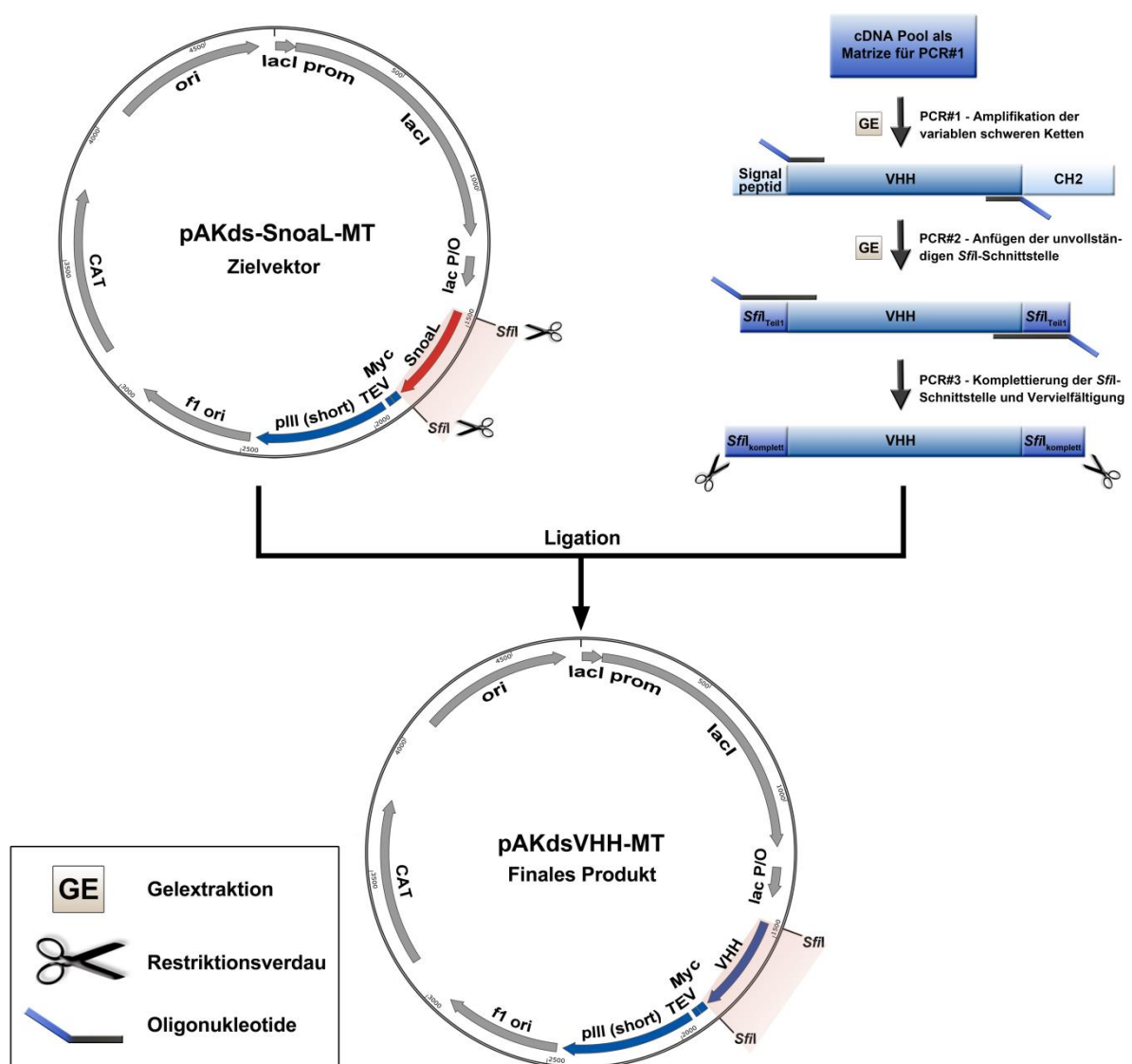


Abbildung 22: Klonierungsstrategie zur Herstellung einer VHH-Bibliothek im Phagen-Format. Die VHH-DNA wurde in einer dreistufigen-PCR isoliert und amplifiziert (oben rechts). Zielvektor (oben links) und VHH-DNA wurden anschließend mittels *Sfi*I verdaut (Scherensymbol) und ligiert. Das Ligationsergebnis (unten) wurde für die anschließende Transformation von *E. coli* verwendet.

Auch hier wurde die VHH-DNA über ein Agarosegel gereinigt, um verbliebene Verunreinigungen durch VH-DNA zu entfernen (vergleiche Abbildung 23). Der letzte PCR-Schritt (PCR#3) vervollständigte die *Sfi*I-Schnittstelle und diente zur Vervielfältigung der VHH-DNA (Abbildung 22, Abbildung 23). Der Zielvektor wurde nach der Restriktion mittels Sucrosegradientenzentrifugation (3.3.4) gereinigt. Nachfolgend sind die Vorbereitung der DNA und die Klonierung der Bibliothek beschrieben.

#### 4.1.3.1 Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die generierte cDNA wurde, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, vollständig als Matrize in der ersten PCR-Reaktion verarbeitet und das amplifizierte VHH-DNA Material per Gelextraktion gereinigt. Für PCR-Schritt 2 (PCR#2) wurden 20 Ansätze mit den Oligonukleotiden LVHH-PCR2\_up bzw. lo (Tabelle 3) generiert (3.4.3) und das Produkt nach der Amplifikation erneut über ein 2 % Agarosegel (3.3.5) aufgetrennt (Abbildung 23 A) sowie die Bande mit der VHH-DNA extrahiert (3.3.6).

Zur Vervollständigung der *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen sowie zur quantitativen Vervielfältigung der VHH-DNA wurde das gereinigte PCR-Produkt aus PCR#2 in einer weiteren PCR (PCR#3) verwendet (3.4.3). Es wurden 192 Einzelansätze mit den Oligonukleotiden LVHH-PCR3\_up bzw. lo (Tabelle 3) durchgeführt und die PCR-Produkte (Abbildung 23) mithilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (3.3.6) gereinigt. Die DNA-Ausbeute wurde photometrisch auf 445 µg bestimmt (3.3.9).

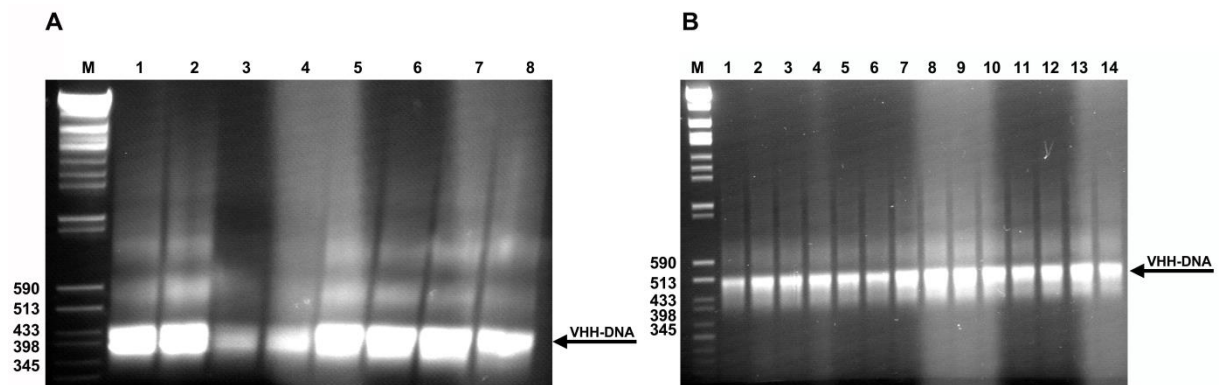


Abbildung 23: Agarosegelelektrophorese (2 % (w/v)) zur Analyse von PCR-Schritt 2 (A) und 3 (B) zur Amplifizierung und Modifizierung der VHH-DNA. Es wurden 8 (A, 1-8) bzw. 14 (B, 1-14) zufällig ausgewählte PCR-Ansätze mit jeweils 4 µl PCR-Mix und 1 µl Sucrosepuffer gemischt aufgetragen. Die Bande der VHH-DNA ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. M: *Lambda DNA/Eco47I (AvaII)*, 13 Marker. Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

#### 4.1.3.2 Vorbereitung von VHH-DNA und Vektor sowie anschließende Klonierung

Für die Klonierung der VHH-DNA in den gewünschten Vektor zur Erstellung einer VHH-Bibliothek im Phagen-Format wurden beide Komponenten zunächst mit *Sfi*I (Fa. NEB) gespalten (3.4.1). Beide Restriktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml durchgeführt. 500  $\mu$ l (1 mg) pAKds-SnoaL-MT Plasmid-DNA wurden mit 1277  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l Puffer 4, 20  $\mu$ l BSA-Lösung und 3  $\mu$ l *Sfi*I versetzt und für 48 Std bei 50 °C inkubiert. Nach 24 Std wurden weitere 3  $\mu$ l *Sfi*I hinzugegeben. Die Reinigung des linearisierten Vektors erfolgte über einen Sucrosegradienten (3.3.4), wofür die 2 ml Restriktionsansatz auf sechs Gradienten aufgeteilt und bei 30.000 U/min für 20 Std zentrifugiert wurden. Die Analyse der gesammelten Fraktionen der Gradientenzentrifugation ist in Abbildung 24 dargestellt und zeigt exemplarisch eines der Agarosegele, welches einen der sechs Gradienten darstellt. Es sind lediglich zwei Banden, eine Bande bei etwa 4300 bp (pAKds-MT) und eine bei etwa 600 bp (SnoaL), zu erkennen. Die Fraktionen, die ausschließlich Vektor-DNA und keine DNA in Höhe von 600 bp beinhaltenen, wurden vereinigt und mit dem *Wizard*<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System Kit gereinigt (3.3.6). Die photometrische Bestimmung (3.3.9) ergab eine DNA-Konzentration von 395  $\mu$ g/ml.

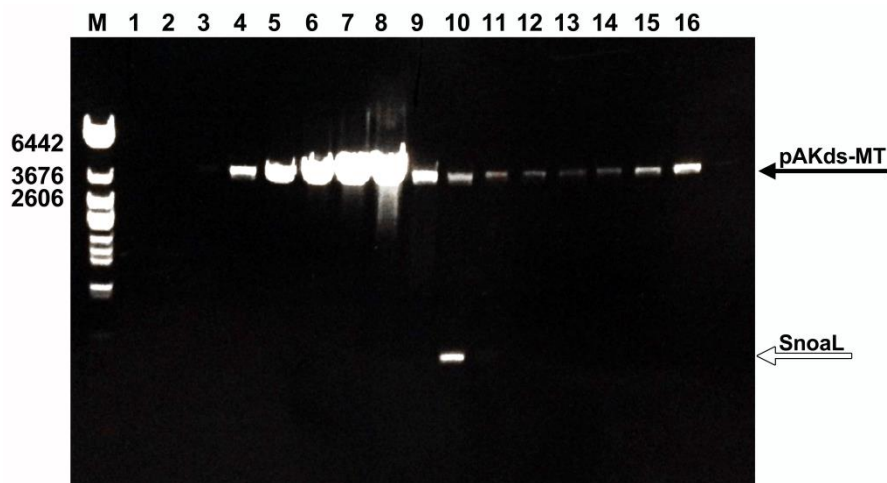


Abbildung 24: Beispiel einer Agarosegelelektrophorese der Sucrosegradientenzentrifugation zur Trennung des DNA-Fragments SnoaL (~600 bp, weißer Pfeil) vom linearisierten Vektor pAK200MT (~4300 bp, schwarzer Pfeil). M: *Lambda* DNA/*Eco*47I (*Ava*II), 13 Marker. Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

Die VHH-DNA wurde vollständig für den Restriktionsverdau eingesetzt (1450  $\mu$ l) und mit 330  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l Puffer 4, 20  $\mu$ l BSA-Lösung und 2  $\mu$ l *Sfi*I versetzt (3.4.1). Der Verdau erfolgte ebenfalls für 48 Std bei 50 °C im Inkubator. Auch hier wurden nach 24 Std zusätzliche 2  $\mu$ l *Sfi*I hinzugegeben. Die Reinigung erfolgte ebenfalls mittels *Wizard*<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (3.3.6). Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (3.3.9) ergaben 330  $\mu$ g/ml.



Für die Ligation (3.4.2) beider Komponenten (VHH und pAKds-MT) wurde ein Reaktionsvolumen von 4 ml gewählt, bestehend aus 840  $\mu\text{l}$  (355  $\mu\text{g}$ ) *phagemid* Vektor, 800  $\mu\text{l}$  (330  $\mu\text{g}$ ) VHH-DNA, 400  $\mu\text{l}$  T4-Ligasepuffer, 1880  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O und 80  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde für 24 Std bei etwa 15 °C inkubiert und im Anschluss mithilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kits (3.3.6) gereinigt.

#### 4.1.3.3 Generierung der VHH-Bibliothek durch Transformation von *Escherichia coli* ER2738

Für die Generierung der VHH-Bibliothek im Phagen-Format, wurden 66 Einzeltransformationen durchgeführt (3.7.1). Das Ligationsprodukt wurde dabei gleichmäßig auf die Transformationsansätze verteilt (je 15  $\mu\text{l}$ ). Die Ausplattierung erfolgte im Anschluss nach Vorgaben unter 3.7.1. Die Auswertung der Verdünnungsplattierungen, nach 30 Std, ergab eine Transformationseffizienz von  $2,64 \times 10^9$  (für die Verdünnungsplatten  $10^{-6}$ ) bzw.  $4,1 \times 10^9$  (für die Verdünnungsplatten  $10^{-7}$ ). Die Komplexität der Bibliothek wurde daher durch den Mittelwert auf  $3,4 \times 10^9$  bestimmt. Dies entsprach einer durchschnittlichen Transformationseffizienz von etwa  $5,2 \times 10^7$  erzeugter Transformanden pro Elektroporation.

#### 4.1.4 Validierung der VHH-Bibliothek im Phagen-Format

Um zu untersuchen, ob bei der Generierung der VHH-Bibliothek VHH-DNA korrekt ligiert sowie anschließend *E. coli*-Zellen transformiert wurden, und um eine erste Einschätzung über die erzeugte Diversität machen zu können, wurden verschiedene Analyse-Schritte durchgeführt. Zunächst wurden 23 Einzelklone mittels Kolonie-PCR getestet (3.4.4). Hierbei wurden die Oligonukleotide LVHH-PCR2\_up bzw. lo eingesetzt (Tabelle 3), die spezifisch VHH-DNA nachweisen. Alle zufällig ausgewählten Einzelklone zeigten eine erwartete Bande in Höhe von etwa 400 bp.

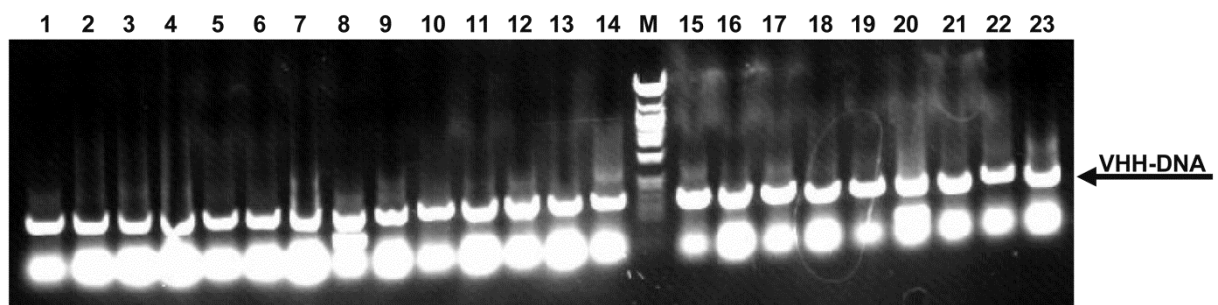


Abbildung 25: Agarosegelelektrophoretische Analyse der 23 zufällig ausgewählten Einzelklone durch Kolonie-PCR. Es wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  des PCR-Ansatzes mit 2  $\mu\text{l}$  Sucrosepuffer gemischt und auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die erwartete Bande der amplifizierten VHH-DNA bei etwa 500 bp ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. M: *Lambda DNA/Eco47I (AvaII)*, 13 Marker.

Weitere 10 Einzelklone wurden zufällig ausgewählt, deren Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Als Oligonukleotid wurde M13\_reverse (Tabelle 3) verwendet, welches im Bereich der

Signalsequenz des Vektors hybridisiert. Die Sequenzen wurden mittels *ClustalW-alignment* (BioEdit) unter Verwendung eines globalen Sequenz-alignments mit einer publizierten VHH-Sequenz <sup>[198]</sup> verglichen (siehe Abbildung 26). Das Resultat zeigte eindeutige Übereinstimmungen in den *framework* Bereichen (Fr-1, 2, 3 und 4). Die für VHH-Fragmente typischen, konstitutiven Substitutionen im Bereich des *framework* 2 (Val38Phe/Tyr, Gly45Glu/Gln, Leu46Arg/Cys und Trp48Gly/Ser/Leu/Phe) konnten ebenfalls in allen zehn Sequenzen beobachtet werden (Abbildung 26, grüne Pfeile) <sup>[44]</sup>. In drei der zehn Sequenzen waren zusätzliche *inter-loop* Cysteine vorhanden (Abbildung 26, gelb unterlegt).

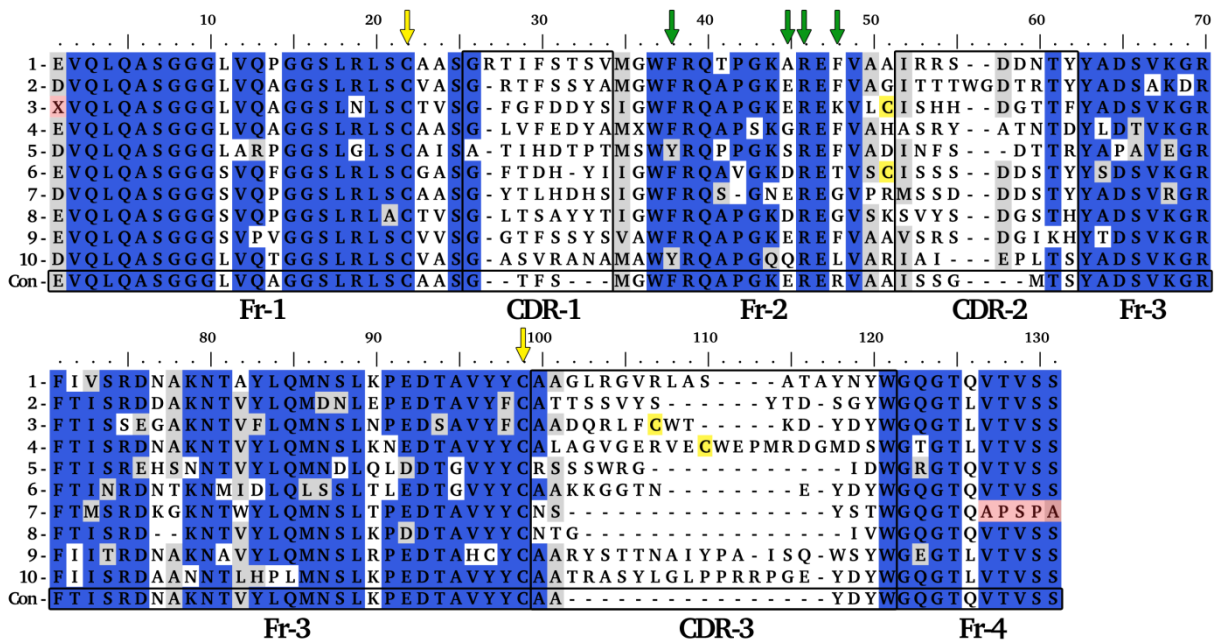


Abbildung 26: *Alignment* der zufällig ausgewählten Einzelklone 1-10 der VHH-Bibliothek im Phagemid-Format. Als Referenz wurde eine publizierte VHH-Sequenz (Con; Monegal *et al.* 2009 <sup>[198]</sup>) verwendet, welche in der untersten Reihe im schwarzen Kasten aufgeführt ist. Konservierte Bereiche sind blau, Bereiche mit hoher Übereinstimmung grau unterlegt. Die Bedingungen für den *threshold* wurden dabei auf 70 % gesetzt. Die *framework*- sowie CDR-Bereiche sind unterhalb der Sequenzen beschriftet. Intradomänen-Cysteine sind oberhalb der Sequenzen mit einem gelben Pfeil, zusätzliche Interloop-Cysteine gelb hinterlegt markiert. Grüne Pfeile markieren in VHH-Regionen typische substituierte Aminosäurereste (*hallmarks*) <sup>[44]</sup>. Aminosäureposition 1 des Einzelklons 3 konnte nicht translatiert werden (mit X gekennzeichnet und rot unterlegt). Bei Einzelklon 7 kam es durch eine einzelne Deletion am C-Terminus zu einer Veränderung der letzten fünf Aminosäuren (rot unterlegt).

Zusätzlich wurde die Sequenz des Einzelklons 1 (vergleiche *alignment* Abbildung 26) durch BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) mit NCBI (*national center for biotechnology information*) Online-Datenbanken verglichen, um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine Lama VHH-Sequenzen handelt (siehe Abbildung 27). Die BLAST-Suche ergab mehrere Treffer, die mit einem *E-value* von  $\sim 10^{-51}$ - $10^{-62}$  mit variablen Schwerketten Domänen aus Lamas übereinstimmen.



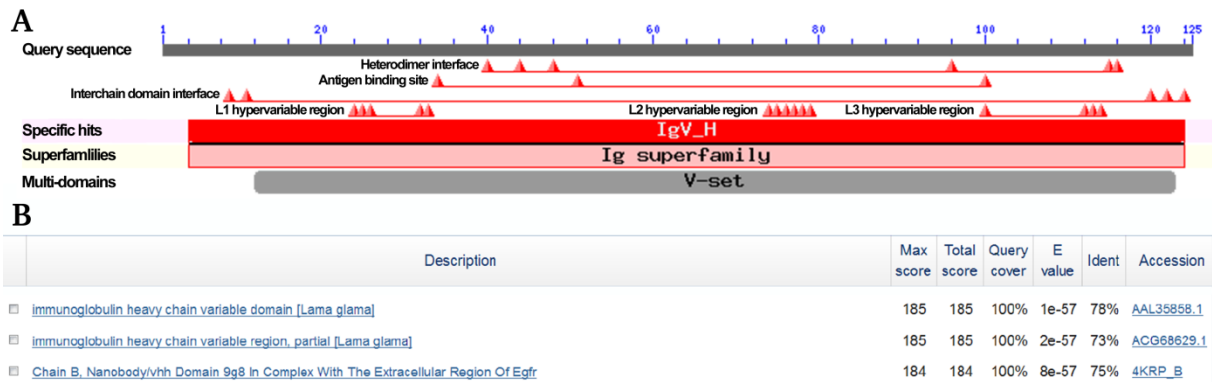


Abbildung 27: Resultat der BLAST-Analyse (Pubmed, NCBI) des Einzelklons 1 (vergleiche Abbildung 15). Grafisch gezeigt sind putativ konservierte Domänen sowie Übereinstimmungen in Molekül-Familien (A). In der Tabelle ist ein Auszug aus der Liste der einzelnen Treffer mit Übereinstimmungs-Daten (*max score*, *total score*, *query cover*, *E value* und *ident*) abgebildet (B). Die Grafische Auswertung wurde Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) entnommen.

Um eine Aussage über die Qualität und Einsetzbarkeit der VHH-Bibliothek machen zu können, wurde diese mehrfach in der AK Kolmar im Hochdurchsatz durchmustert und gegen verschiedene Antigene, wie beispielsweise Saglin<sup>[5], [163]</sup>, Factor XIII<sup>[199]</sup>, HtrA1<sup>[6]</sup>, Matriptase<sup>[15]</sup> und Thioredoxin<sup>[200]</sup>, Binder isoliert.

#### 4.1.5 Diskussion

Wie in den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.4 beschrieben, konnte im ersten Teil dieser Arbeit eine VHH-Antikörper-Bibliothek im Phagen-Format hergestellt werden. Zunächst erfolgten die Isolierung der Lymphozyten aus dem Vollblut von Lamas und die anschließende Aufbereitung des Blutes sowie die Isolierung der Lymphozyten (4.1.2). Aus 1080 ml Vollblut konnten dabei  $7,2 \times 10^8$  Lymphozyten isoliert werden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA vollständig aus den Lymphozyten isoliert (4.1.2), die wiederum als Matrize für die Amplifizierung und Modifizierung der VHH-DNA diente. Die gelelektrophoretischen Analysen der RNA-Extraktion aus den Lymphozyten sowie des ersten PCR-Schritts zur Amplifikation der DNA der schweren Antikörperketten zeigten die erwarteten Banden (vergleiche Abbildung 21). Sowohl die beiden signifikanten Banden der 18 s bzw. 28 s rRNA als auch die Banden für die VH- und VHH-Fragmente (850 bp und 600 bp) konnten nachgewiesen werden. Die nachfolgenden DNA-Modifikationen in PCR#2 und PCR#3 (4.1.3.1) zeigten ebenfalls entsprechende Banden in Höhe von etwa 400 und 460 bp (Abbildung 23). Nach anschließender Klonierung der VHH-DNA in den Zielvektor pAK200-MT (4.1.3.2) und Transformation von *E. coli* ER2738, konnte eine VHH-Bibliothek im Phagen-Format in einer Größe von  $3,4 \times 10^9$  Transformanden generiert werden (4.1.3.3). Eine anschließende Evaluierung der Bibliothek durch Kolonie-PCR und Sequenzierung von Einzelklonen (4.1.4) zeigte, dass bei allen analysierten Einzelklonen ein VHH-Gen in den Vektor pAK200-MT integriert wurde (Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27).

Die Antikörper produzierenden B-Zellen stellen unter den Lymphozyten einen Anteil von maximal 20 %. VHHs wiederum machen einen Anteil von etwa 25 % aller Antikörper im Lama aus. Bei einer eingesetzten Anzahl von  $7,2 \times 10^8$  Lymphozyten für die RNA-Extraktion ergibt dies eine maximale Diversität von etwa  $3,6 \times 10^7$  <sup>[198]</sup>. Dieser Wert wird zusätzlich noch durch die PCR bedingt eingebrachten Mutationen etwas gesteigert, da hier vor allem mit nicht optimierter Taq-Polymerase gearbeitet wurde, die keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und eine Fehlerrate von etwa  $8 \times 10^{-6}$  pro repliziertem Basenpaar besitzt. Außerdem wurde zur Amplifizierung der VHH-DNA eine dreistufige PCR-Strategie angewandt, welche diesen Faktor ebenfalls noch verstärkt. Bei der hier vorliegenden Bibliotheksgröße von  $3,4 \times 10^9$  Transformanden würde dies ein *oversampling* mit einem Faktor von beinahe 100 bedeuten. Mit der Annahme aus 4.1.4, dass ein Großteil der Klone funktional ist, deuten diese auf eine funktionale Bibliotheksgröße von mindestens  $3,6 \times 10^7$  hin.

#### 4.1.6 Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek im Hefe-Format

Zusätzlich zur VHH-Antikörper-Bibliothek im Phagen-Format sollte ebenfalls die Hefe zur Oberflächenpräsentation genutzt werden. Hierfür wurde das Präsentationsformat mittels Aga1p und Aga2p nach Wittrup *et al.* verwendet <sup>[126], [127]</sup>.

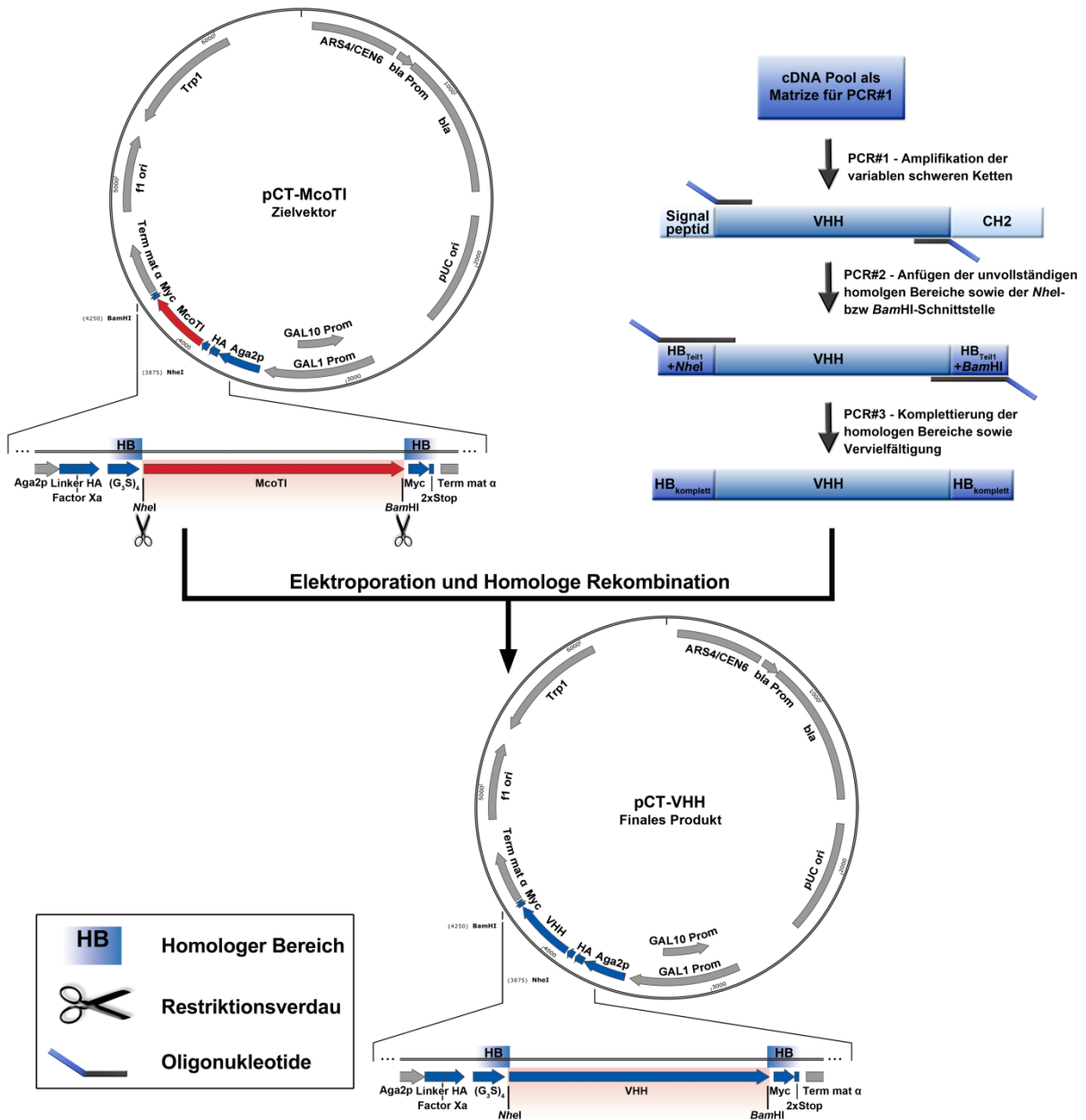


Abbildung 28: Klonierungsstrategie zur Herstellung einer VHH-Bibliothek im Hefe-Format. Die VHH-DNA wurde in einer dreistufigen-PCR isoliert sowie amplifiziert (oben rechts) und dabei homologe Sequenzbereiche (HB) angefügt. Der Zielvektor (pCT-McoTI, oben links) wurde mit *NheI* und *BamHI* verdaut (Scherensymbol). Anschließend wurden Hefezellen mit linearisiertem Vektor und VHH-DNA transformiert. Die Integration der VHH-DNA erfolgte durch homologe Rekombination. Das finale Vektorkonstrukt (pCT-VHH) ist unten abgebildet.

Das zu präsentierende VHH-Gen wurde dabei von einem N-terminalen HA-Epitop und einem C-terminalen Myc-Epitop flankiert sowie an das Gen für a-Agglutinin 2 (Aga2p) fusioniert (Abbildung 28; 1.6.2). Verwendet wurde hier der Vektor pCT (2.5.2), welcher bereits über alle benötigten Gene sowie geeigneten Schnittstellen verfügte. Die Genexpression steht dabei unter Kontrolle eines Gal-Promotors, die Selektion erfolgt durch einen Tryptophan-Auxotrophiemarker. Das Gegenstück zu Aga2p, a-Agglutinin 1 (Aga1p), ist im Hefegenom des verwendeten *S. cerevisiae*-Stammes EBY100 (2.1) integriert und steht ebenfalls unter Kontrolle eines Galaktose-Promotors. Die Induktion der Genexpression durch Galaktose führt zum einen zur Lokalisation der GPI-Protein-Untereinheit Aga1p in der Zellwand und zum anderen zur Oberflächenpräsentation des Aga2p-VHH-Fusionsproteins durch Bindung an Aga1p über zwei Disulfide (1.6.2).

Die Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vektors sah vor, durch eine Dreischritt-PCR-Reaktion, ähnlich der in 4.1.3, ein VHH-Fusions-Amplifikat herzustellen, das über homologe Rekombination in den zuvor linearisierten Vektor pCT integriert werden sollte (Abbildung 28 und Abbildung 29) <sup>[201]–[203]</sup>. Die homologen Bereiche in VHH-Amplifikat und Zielvektor wurden mit einer Basenlänge von 30 bp definiert. Der Vektor pCT wurde dabei nach Wittrup *et al.* <sup>[126], [127]</sup> verwendet und die VHH-Gene zwischen den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *BamHI* integriert (Abbildung 28). Als Ausgangsvektor wurde pCTMcoTI verwendet, der in der Klonierungsstelle das etwa 100 bp lange Gen für das Miniprotein McoTI aus *Momordica cochinchinensis* trug.

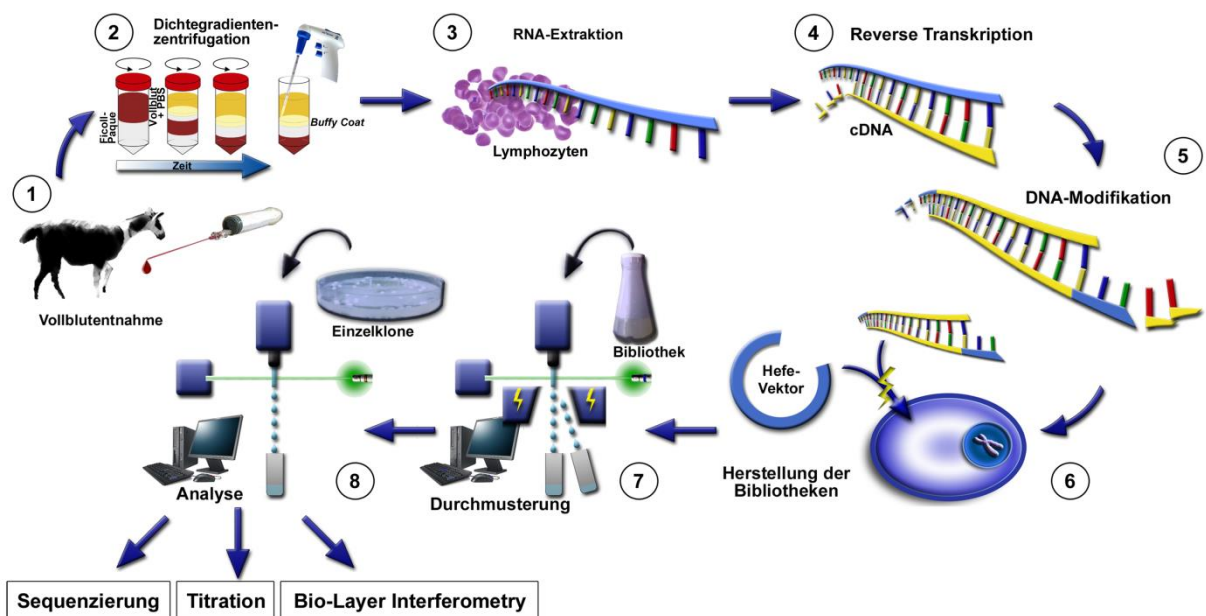


Abbildung 29: Vollständige Strategie zur Herstellung und anschließenden Verwendung der VHH-Bibliothek in Hefen. In den Schritten 1-3 soll die genetische Information für das VHH-Repertoire isoliert werden. Die Schritte 4-5 beinhalten DNA-Modifikation und Transformation der Hefezellen zur Generierung der VHH-Bibliothek. Schritte 7-8 zeigen die möglichen Durchmusterungs- und Analyse-Methoden zur Isolierung Antigen bindender VHH-Kandidaten.

#### 4.1.6.1 Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA sowie des Vektors pCT

Für die Modifikation der VHH-DNA wurde ebenfalls das generierte Amplifikat aus PCR#1 (siehe 4.1.2) verwendet und in zwei PCR-Schritten für die Klonierung in den Hefvektor pCT angepasst sowie vervielfältigt. Das gereinigte und von VH-DNA getrennte VHH-Amplifikat aus PCR#1 (4.1.2) wurde hierfür wieder in einer zweiten PCR (3.4.3, PCR#2) zusammen mit den Oligonukleotiden LVHH-pCT-PCR2\_up bzw. lo (Tabelle 3) eingesetzt, um die DNA entsprechend zu modifizieren. In diesem Schritt wurden die Restriktionsschnittstellen *NheI* (N-terminal) und *BamHI* (C-terminal) sowie Teile der homologen Bereiche angefügt (Abbildung 28, Abbildung 30 A). Nach der PCR-Amplifikation wurden einige Reaktionsansätze willkürlich ausgewählt und gelelektrophoretisch analysiert. Die Gelanalyse zeigte das erwartete Bandenmuster in Höhe von etwa 420 bp (Abbildung 30 A). Die VHH-DNA wurden anschließend vereinigt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (3.3.2) sowie Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (3.3.3). Das gereinigte PCR-Produkt diente als Matrize in PCR#3 (3.4.3) in der durch Verwendung der Oligonukleotide pCT-lib\_fwd bzw. rev (Tabelle 3) die homologen Bereiche komplettiert sowie die DNA vervielfältigt wurde (Abbildung 28). Für jede der drei Transformationseinheiten wurden 190 PCR-Reaktionen angesetzt. Die PCR wurde anschließend wieder anhand zufällig ausgewählter PCR-Ansätze gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 30).

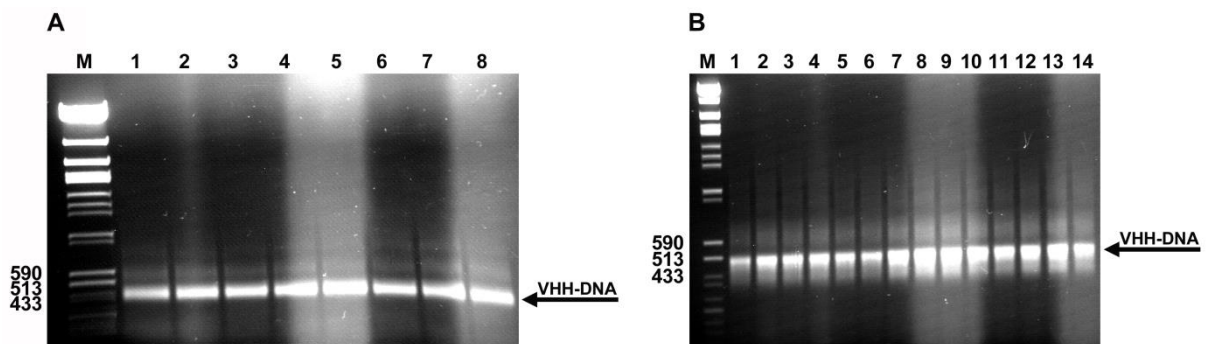


Abbildung 30: Agarosegelelektrophorese (2 % (w/v)) zufällig ausgewählter PCR-Ansätze von PCR#2 (A) und 3 (B). Es wurden jeweils 8 (A, 1-8) bzw. 14 (B, 1-14) Ansätze durch Auftragen von 4  $\mu$ l PCR-Ansatz und 2  $\mu$ l Sucrosepuffer überprüft. Die jeweiligen VHH-Banden sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. M: *Lambda DNA/Eco47I (AvaII)*, 13 Marker. Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

Auch hier zeigte sich das erwartete Bandenmuster in Höhe von etwa 490 bp. Die PCR-Ansätze aus PCR#3 wurden anschließend vereinigt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (3.3.2) sowie mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (3.3.3).

Zur Herstellung des Zielvektors wurde ein pCT-Derivat, welches das Gen für das Cystein-Knoten Miniprotein McoTI beinhaltetete, verwendet. Der Ausgangsvektor pCT-McoTI (Derivat siehe 2.5.2, Abbildung 29) wurde von Janine Fritz zur Verfügung gestellt und zunächst in *E. coli* TOP10 amplifiziert. Hierfür wurde eine *E. coli*-Kultur mit 2 l Volumen verwendet und die DNA mithilfe einer alkalischen Lyse extrahiert (3.3.7.3). Um ausreichende Mengen zu gewährleisten, wurde die Vektor-DNA durch einen Cäsium-Chlorid-Gradienten gereinigt

(3.3.7.3). Der gereinigte Vektor wurde für einen Restriktionsverdau (3.4.1) eingesetzt, um das Gen für McoTI zu entfernen und den Vektor zu linearisieren. Die Ansätze wurden im 1 ml Maßstab durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 20 U *NheI* und *BamHI* (Fa. Fermentas) sowie 1x Tango-Puffer über Nacht inkubiert. Zur Isolierung des linearisierten Vektors wurde der Restriktionsansatz über eine Sucrose-Gradientenzentrifugation aufgetrennt (3.3.4). Je 200  $\mu\text{l}$  Restriktionsansatz wurden auf die Zentrifugationsröhrchen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80.000 g für 21 Std. Anschließend wurden die Gradienten in 500  $\mu\text{l}$  Aliquots geteilt und durch Gelelektrophorese analysiert (3.3.5). Anhand der Analyse konnten diejenigen Aliquots ausgewählt werden, die ausschließlich linearisierten Vektor beinhalteten und für die Erstellung der Bibliothek herangezogen wurden.

---

#### 4.1.6.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 zur Erstellung einer naiven VHH-Bibliothek durch homologe Rekombination

---

Anders als bei der Herstellung der VHH-Bibliothek im Phagen-Format, bei der mit *TypI* Restriktion und anschließender Ligation gearbeitet wurde, bediente man sich hier der homologen Rekombination in Hefezellen<sup>[201]–[203]</sup> sowie der Transformationsmethode nach Benatuil *et al.* (3.7.2)<sup>[178]</sup>. Hierzu wurden über Oligonukleotide in den vorangegangenen PCR-Amplifikationen (PCR#2 und 3) DNA-Sequenzen an die VHH-Gene addiert (vergleiche 4.1.6.1), die zu Bereichen auf dem Vektor pCT (2.5.2) identisch waren. Diese homologen Bereiche flankieren die Klonierungsstelle im Vektor pCT und enden in 5' und 3'-Richtung mit den Restriktionsschnittstellen *NheI* bzw. *BamHI* (Abbildung 28). Wird bei der Elektroporation zeitgleich der linearisierte Vektor sowie die VHH-DNA mit homologen Bereichen eingesetzt, kommt es in der Zelle zur Integration der VHH-DNA in den Vektor pCT und somit zur Erzeugung eines vollständigen zirkulären Vektors mit integriertem VHH-Gen<sup>[201]–[203]</sup>.

Für die Elektroporation wurden zunächst elektrokompente Hefezellen nach Benatuil *et al.* hergestellt (3.7.2, 2.9.2, 2.10). Es wurden drei Transformationsrunden durchgeführt und dafür elektrokompente Hefezellen für insgesamt 54 Elektroporationen hergestellt. Für jede Transformation wurden etwa  $8 \times 10^8$  Hefezellen eingesetzt. Die Zellsuspensionen wurden in einem Volumen von 100-200  $\mu\text{l}$  Elektroporationspuffer (2.10) auf Eis gelagert und der DNA-Mix bestehend aus etwa 4  $\mu\text{g}$  linearisierter Vektor und 10  $\mu\text{g}$  VHH-DNA zugegeben. Die Suspension wurde kurz vorsichtig mit einer Pipette durchmischt, in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und für 2-5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation nach Angaben unter 3.7.2. Dabei wurden in der Regel Pulszeiten von 3,0-4,9 erreicht. Zur Auswertung der Transformationseffizienz wurden Verdünnungsplattierungen mit den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  auf SD(-Trp)-Agarplatten (2.9.2) angefertigt.

Bei den drei Transformationsrunden wurden 24, 10 bzw. 20 Transformationen durchgeführt. Nach der jeweiligen Auswertung der Verdünnungsplatten, die für mindestens 72 Std inkubiert werden mussten, um alle Klone auf den Platten mit bloßem Auge ausmachen zu können, wurden Klonzahlen wie in Tabelle 16 aufgeführt erreicht.



Tabelle 16: Transformationseffizienzen der drei Transformationsdurchläufe zur Erstellung der naiven VHH-Bibliothek in *S. cerevisiae*.

Transformationsdurchlauf	Transformanden Gesamt	Transformanden pro Elektroporation
1	$1 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$
2	$8 \times 10^7$	$8 \times 10^6$
3	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$
Gesamt	$4,8 \times 10^8$	$9,6 \times 10^6$

Die transformierten Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C und 180 U/min kultiviert, anschließend pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Um die Hefen letztendlich lagern zu können, wurden diese nach Chao *et al.* behandelt <sup>[147]</sup>. Hierfür wurde Low-SD(-Trp)-Medium (2.9.2) mit einer Zellzahl an Hefen beimpft, welche der 10-100fachen der Transformationseffizienz entsprach. Dies sollte einen Transfer aller Hefeklone sicherstellen. Das Volumen an Low-SD(-Trp)-Medium (2.9.2) wurde so gewählt, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 erreicht wurde. Die Hefen wurden anschließend über einen Zeitraum von etwa 72 Std kultiviert und die Hefezellen dadurch in die stationäre Wachstumsphase gebracht. Ein Einfrieren der Hefezellen in dieser Phase fördert ihr Überleben bei diesem Vorgang <sup>[147]</sup>. Die Zellen wurden hierfür erneut pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in steriler *freezing solution* (2.10) aufgenommen. Je Aliquot wurde eine Zellzahl entsprechend der 50-100fachen Klonzahl in einer Konzentration von etwa  $10^{10}$  Hefezellen/ml Lösung eingesetzt und für etwa 10 min bei RT inkubiert. Die Aliquots wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.7 Validierung der naiven Hefe-Bibliothek

##### 4.1.7.1 Validierung durch Einzelklon-Sequenzierung

Nach Erstellung der Bibliothek wurden zunächst die Hefezellen auf den Verdünnungsplatten genutzt und die Plasmid-DNA einiger Einzelklone stichprobenartig isoliert (3.3.8), um den Erfolg der Rekombination von VHH-DNA und Zielvektor zu überprüfen. Auf diesem Wege sollte außerdem festgestellt werden, ob die VHH-DNA korrekt amplifiziert wurde.

Sequenzierte VHH-Gene wurden mit *ClustalW-alignment* analysiert (BioEdit). Dabei wurden konservierte und stark randomisierte Bereiche ermittelt, um diese anschließend mit Sequenzen aus der Literatur vergleichen zu können und *framework* sowie CDR-Bereiche einzugrenzen (vergleiche Abbildung 31).

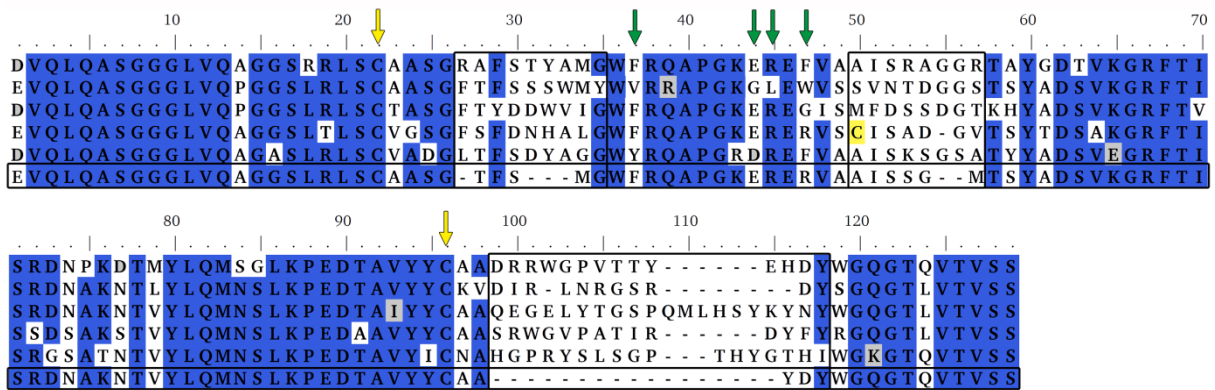


Abbildung 31: *Alignment* von fünf Sequenzen der naiven VHH-Hefe-Bibliothek und einer bereits publizierten Sequenz (schwarzer Rahmen) <sup>[198]</sup> Konservierte Bereiche sind blau, Bereiche mit hoher Übereinstimmung grau unterlegt. Die Bedingungen für den *threshold* wurden dabei auf 70 % gesetzt.

Das *alignment* zeigte, dass alle fünf VHH-Sequenzen starke Homologien, inklusiver der VHH-typischen Substitutionen (Abbildung 31, grüne Pfeile), gegenüber der publizierten VHH-Sequenz aufwiesen (Abbildung 31, schwarzer Kasten). Eine Analyse mit dem NCBI BLAST Algorithmus ergaben Treffer in der Immunglobulin-Superfamilie (Abbildung 32). Variable Schwereketten-Bereiche von *Lama glama* Immunglobulinen werden mit *E-values* in Größenordnungen von  $10^{-60}$ - $10^{-58}$  angegeben.

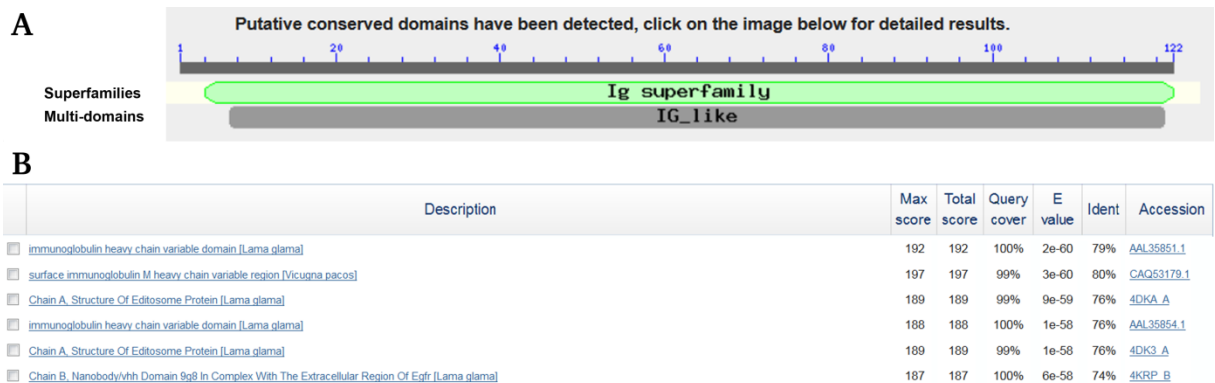


Abbildung 32: Resultat der BLAST-Analyse (Pubmed, NCBI) des Einzelklons 1 (vergleiche Abbildung 31). Grafisch gezeigt sind putativ konservierte Domänen sowie Übereinstimmungen in Molekül-Familien (A). In der Tabelle ist ein Auszug aus der Liste der einzelnen Treffer mit Übereinstimmungs-Daten (*max score*, *total score*, *query cover*, *E value* und *ident*) abgebildet (B). Die Grafische Auswertung wurde Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) entnommen.

#### 4.1.7.2 Validierung mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung

Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA eines Ansatzes isoliert, der die gesamte VHH-Bibliothek repräsentierte. Ein Aliquot einer Kryokultur der VHH-Bibliothek wurde für etwa 10 Std kultiviert und daraus die Plasmid-DNA von etwa  $10^{10}$  Hefezellen isoliert. Diese Plasmid-DNA diente als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung der VHH-Gene für den späteren Einsatz in einer



Sequenzierung (3.3.10) im 454 GS Junior System (Roche). Alle Vollängen-Sequenzen wurden für ein *alignment* verwendet. In Abbildung 33 ist ein Ausschnitt des Sequenz-alignments und die daraus errechneten konservierten Bereiche sowie die Konsensussequenz gezeigt. Außerdem wurden die CDR-Längen (CDR1-3) ermittelt und als Verteilung in Abbildung 34 dargestellt.

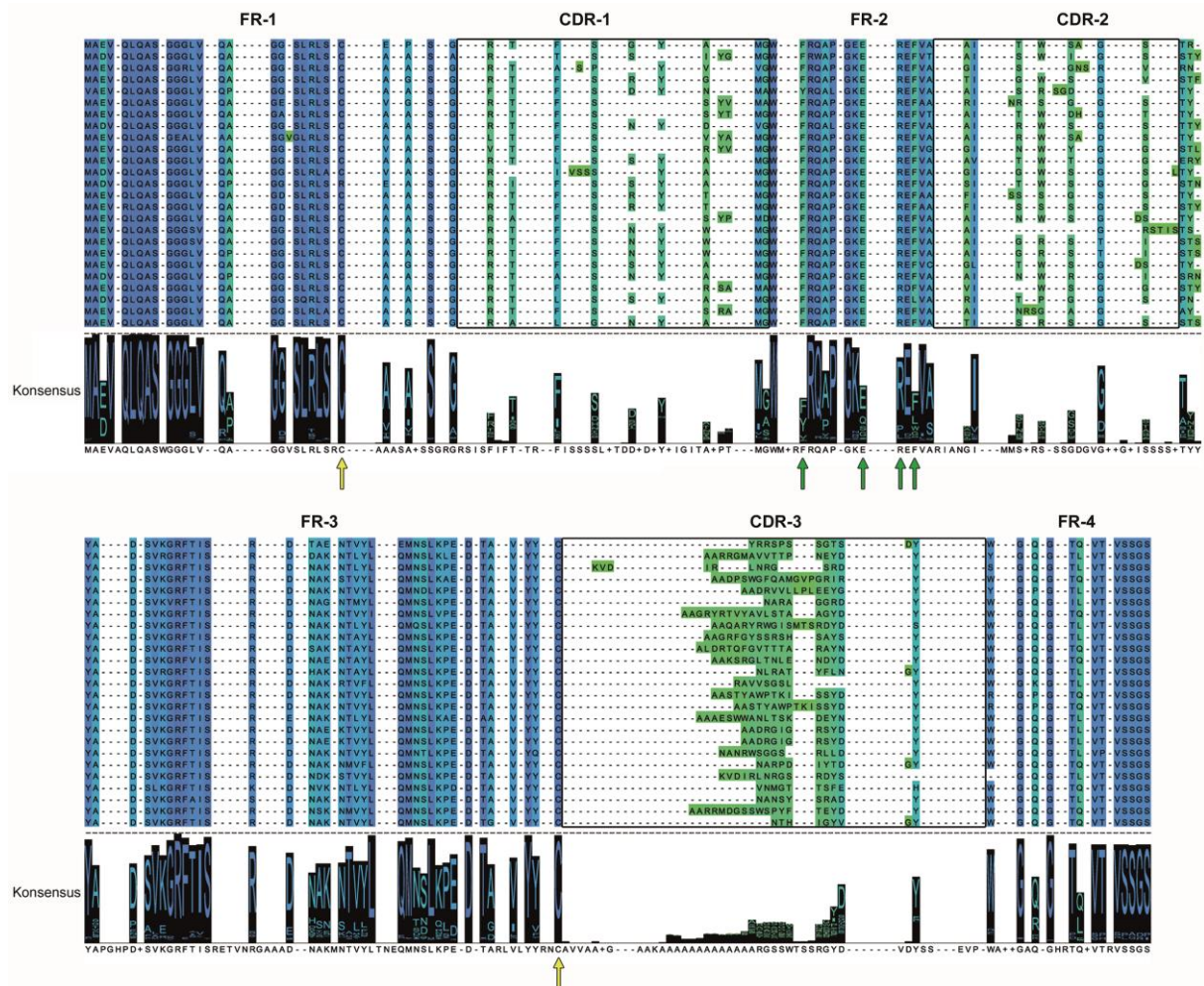


Abbildung 33: *Alignment* der VHH-Bibliothek in Hefen erstellt mit Jalview (v2). Dargestellt sind beispielhaft einige Sequenzen des gesamten *alignments*. Die Fr- und CDR-Bereiche sind über den Sequenzen beschriftet, die CDRs zusätzlich eingerahmt (schwarze Rahmen). Unter den Sequenzen ist die ermittelte Konsensussequenz (Konsensus) mit den Aminosäuren-Varianten an den einzelnen Positionen angegeben. Die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen ist durch ihre relative Beschriftungsgröße in der Konsensussequenz dargestellt. Der Farbcode im gesamten *alignment* markiert weniger variable Positionen dunkelblau, stark variable Positionen grün. Intradomänen-Cysteine sind mit einem gelben Pfeil, VHH-spezifische Aminosäuresubstitutionen (1.4) mit einem grünen Pfeil unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.

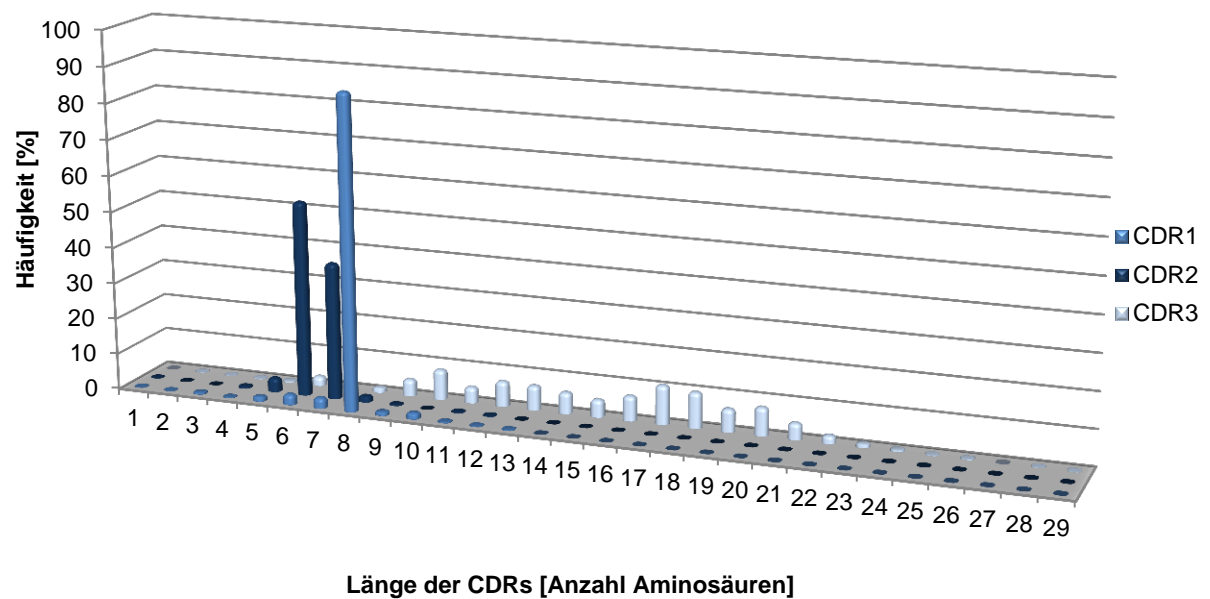


Abbildung 34: CDR-Längenverteilung ermittelt anhand der zuvor im 454 GS Junior System (Roche) erstellten Sequenzdatenanalyse (Abbildung 33).

#### 4.1.7.3 Mikroskopische und Durchflusszytometrische Analyse

Zusätzlich zu den Sequenzanalysen wurde eine Durchmusterung anhand eines Kontroll-Antigens durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es sollte sichergestellt werden, dass eine Oberflächenexpression induziert und eine Anreicherung generell möglich ist. Als Antigen wurde hierfür ein polyklonaler Ziegenantikörper verwendet. Nach drei Durchmusterungsrunden wurde ein Einzelklon kultiviert und die Genexpression induziert (3.2.2). Anschließend wurde zum einen das Myc-Epitop fluoreszenzmarkiert als auch eine Immunmarkierung mit Ziegen-IgG-Biotin Konjugat und SAPE durchgeführt (3.8.1).

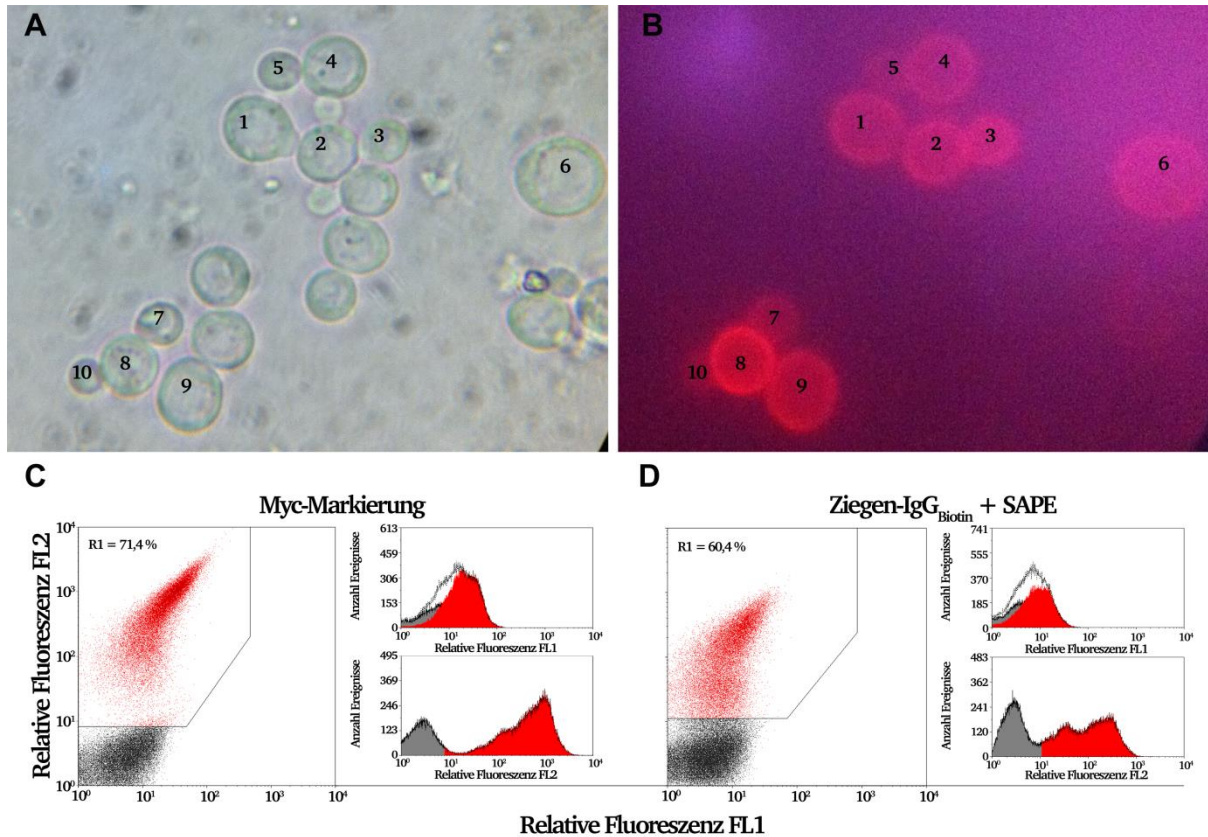


Abbildung 35: Analyse der Markierung des Myc-Epitops (C) sowie der Immunmarkierung mit Ziegen-IgG-Biotin Konjugat und SAPE (A, B und D). Die Analyse mit Ziegen-IgG wurde sowohl mit einem Fluoreszenzmikroskop (A=Durchlicht; B=Fluoreszenz, PE-Kanal), als auch mit einem FACS (D) durchgeführt. Zur einfacheren Orientierung wurden die positiv markierten Hefezellen mit einer Zahlenreihe (1-10) beschriftet. Verwendet wurde ein Zeiss Mikroskop Axioskop (Tabelle 6) und ein Okular mit 60-facher Vergrößerung. Die Photographien wurden mit einer Handykamera (Samsung SGH) aufgenommen. Die durchflusszytometrischen Analysen sind sowohl als zwei-dimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse), als auch mit den durch *gating* dazugehörigen Histogrammen beider Fluoreszenzkanäle dargestellt. Region R1 kennzeichnet die positiv markierten Hefezellen. In den Histogrammen sind in Weiß die Gesamtpopulation, in Grau die Ereignisse außerhalb von R1 und in Rot die Ereignisse innerhalb R1 des Dotplots dargestellt. Die Prozentangaben der Region R1 sind in den jeweiligen Dotplots angegeben.

Beide Proben wurden durchflusszytometrisch im FACS sowie fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 35). Mikroskopisch wurden die Hefezellen sowohl mittels Durchlicht (Abbildung 35 A), als auch Fluoreszenz im PE-Kanal (Abbildung 35 B) dokumentiert. Die Probe zeigt vitale Hefezellen ohne erkennbare Kontaminationen. Im PE-Kanal zeigt etwa die Hälfte der Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal. Das Fluoreszenzsignal im Durchflusszytometer zeigt ein äquivalentes Signal (Abbildung 35 D). Etwa 60 % der Hefezellen sind in der Region R1 lokalisiert.

---

#### 4.1.8 Diskussion

---

In den Abschnitten 4.1.6 und 4.1.7 ist die erfolgreiche Herstellung einer VHH-Bibliothek in Hefen beschrieben. Die Amplifikation der VHH-DNA erfolgte hier ebenfalls über eine dreistufige PCR (Abschnitt 4.1.6.1). In den gelelektrophoretischen Analysen konnten alle erwarteten Bandenmuster beobachtet werden (Abbildung 30). Die Transformationseffizienz unter Verwendung der Elektroporationsmethode nach Benatuil *et al.* (3.7.2) lag bei etwa  $1 \times 10^7$  Transformanden pro Elektroporation (Tabelle 16) noch eine Größenordnung unter dem publizierten Optimum bei der Herstellung von humanen Antikörper-Bibliotheken <sup>[178]</sup>. Dieser Faktor konnte jedoch ausreichend durch eine höhere Anzahl an Elektroporationen ausgeglichen werden und eine Gesamtzahl  $4,8 \times 10^8$  Transformanden konnte generiert werden. Die Effizienz konnte zudem von  $4,2 \times 10^6$  auf etwa  $1 \times 10^7$  Transformanden pro Elektroporation gesteigert werden (Tabelle 16). Eine erste Sequenzanalyse anhand von fünf Einzelklonen zeigte die Integration korrekt amplifizierter VHH-DNA in den Zielvektor (Abbildung 31). Eine anschließende BLAST-Analyse ergab eine hohe Homologie zu der kameliden Immunglobulin Superfamilie. Dabei wurden *E-values* für variable Schwereketten-Bereiche von *Lama glama* in Größenordnungen von  $10^{-61}$ - $10^{-50}$  angegeben (4.1.7.1). Die Sequenzanalyse mittels 454 GS Junior System (Roche) deutete darauf hin, dass eine diverse Aminosäuren-Verteilung in den CDRs und eine große Längen-Variabilität der CDR3 vorhanden war (4.1.7.2). Auch hier gilt die gleiche Annahme bezüglich der maximalen Bibliotheksgröße von  $3,6 \times 10^7$  bedingt durch die Verarbeitung der Anzahl an Lymphozyten von  $7,2 \times 10^8$  <sup>[198]</sup>. Dies würde bei der vorliegenden Bibliothek mit einer Größe von  $4,8 \times 10^8$  Transformanden ein *oversampling* von nur einem Faktor von 10 bedeuten. Die funktionale Diversität würde in diesem Falle eher ein wenig unter dem Maximalwert von  $3,6 \times 10^7$  liegen. Eine erste durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Validierung zeigte eine eindeutige Zugänglichkeit des Myc-Epitops (Abbildung 35 C) sowie die Möglichkeit zur Markierung mit einem Antigen und der Anreicherung von Bindern (Abbildung 35 A, B und D).



#### 4.1.9 FACS gestützte Durchmusterung der Hefe-Bibliothek

Im Folgenden wurde die VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen verschiedene Antigene durchmustert. Dabei sollte zunächst die Präsentierbarkeit der VHH-Aga2p-Fusionsproteine auf der Oberfläche der Hefen gezeigt sowie die Durchmusterungsstrategie optimiert werden. Begonnen wurde mit der Durchmusterung gegen humanes C4bp-Bindeprotein (hC4bp; siehe 1.7) <sup>[161], [162]</sup>, das von Thomas Hofmeyer zur Verfügung gestellt wurde. Im späteren Verlauf wurden Saglin aus der Anopheles-Mücke (siehe 1.7) <sup>[5], [163]</sup> sowie humanes P-Cadherin (siehe 1.7) <sup>[2], [166], [167]</sup> für weitere Durchmusterungen herangezogen.

Zu Beginn, also in der ersten Sortierungsrunde, sollte jedes Mal das Zehnfache der Diversität durchmustert werden. Bei einer maximalen funktionalen Diversität von errechneten  $3,6 \times 10^7$ , würde dies einer benötigten Anzahl an durchmusterten Ereignissen im FACS von etwa  $4 \times 10^8$  entsprechen.

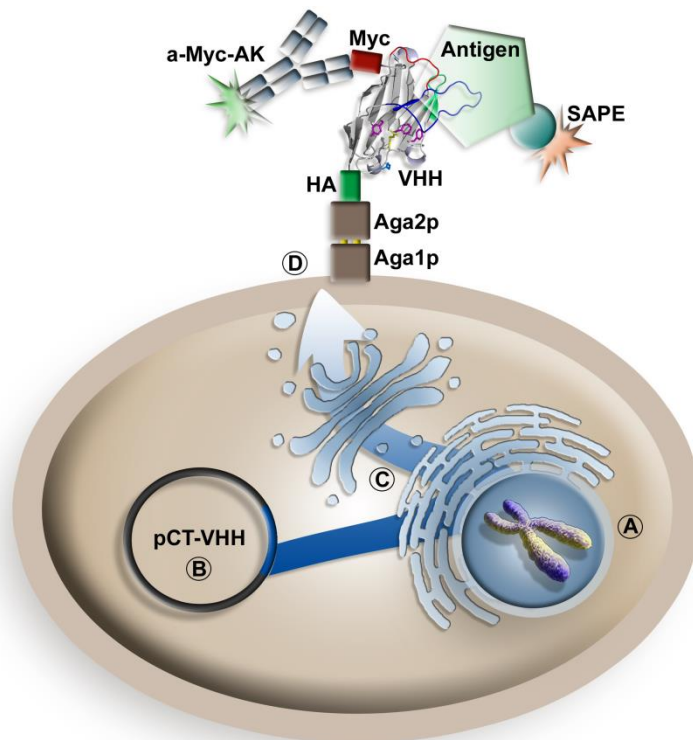


Abbildung 36: Die einzelnen Schritte für die Durchmusterung der VHH-Bibliothek durch Oberflächenpräsentation auf Hefen. Die Induktion der Gal-Promotor gesteuerten Genexpression führt zur Verankerung des Aga1p (genom-codiert, (A)) in der Zellwand (D) und zur Lokalisierung des Aga2p-VHH-Fusionsproteins (plasmidcodiert, (B)) auf der Hefeoberfläche (D). Beide a-Agglutinin-Untereinheiten durchlaufen den Sekretionsweg der Hefe (C). Die Oberflächenpräsentation kann durch Markierung des Myc-Epitops überprüft werden (E). Die Antigenbindung wird durch Markierung mit SAPE oder Anti-His-Epitop-Antikörpern nachgewiesen (F).

Vor jeder Durchmusterung wurde die Oberflächenpräsentation durch Markierung des Myc-Epitops analysiert (Abbildung 36; 3.8.1). Die Kultivierung der Hefezellen sowie Induktion der Genexpression erfolgten nach Angaben unter 3.2.1 und 3.2.2. Die Antigenbindung wurde entweder durch vorherige Biotinylierung des Antigens und anschließende Bindung durch

SAPE oder durch Bindung eines Antikörpers am Antigen-His-Epitop markiert (Abbildung 36; 3.8.1).

#### **4.1.9.1 Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Bindern gegen humanes C4b Protein**

Zu Beginn wurde die Hefe-Bibliothek aus einer Kryokultur (-80 °C) in 1 l SD(-Trp)-Medium (2.9.2) bei Standardbedingungen über Nacht kultiviert, einmal passagiert und anschließend die Oberflächenexpression induziert (3.2.1). Dann wurde zunächst die Oberflächenexpression durch Markierung des Myc-Epitops analysiert (3.8.1) und die Hefezellen anschließend im FACS (Beckman Coulter) durchmustert (3.8.2). Es wurden insgesamt vier Durchmusterungsrunden durchgeführt, wobei in Runde 1-3 direkt ein Resort angeschlossen wurde. Generell wurde auf eine Doppelmarkierung (simultane Myc- sowie Antigen-Markierung) verzichtet, da die Messungen des PE- sowie FITC-Signals mit nur einem blauen Laser (488 nm) durchgeführt wurden und dies zu starken spektralen Überschneidungen im PE-Kanal auch nach vorheriger Kompensation führt. Lediglich in Runde 3 wurde eine Doppelmarkierung durchgeführt. Während der kompletten Durchmusterung wurde eine Antigenkonzentration von 500  $\mu$ M hC4bp gewählt. Das hC4bp wurde zuvor biotinyliert (3.5.7) und konnte so in der Durchmusterung mittels SAPE nachgewiesen werden. Zwischen den einzelnen Runden wurden die Hefezellen wieder wie in 3.2.2 beschrieben kultiviert und die Genexpression induziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 aufgeführt, wobei die Zellzahlen und die prozentualen Anteile der Ereignisse für die Region R1 sowie die Gesamtereignisse angegeben sind.

Die Durchmusterung zeigt eine eindeutige Anreicherung an fluoreszenzmarkierten Hefezellen über die einzelnen Runden (Abbildung 37). Die Region R1 zur Bestimmung des Sortierungskriteriums wurde in Runde 2 und 4 sowie in den darauffolgenden Rücksortierungen stringenter gelegt, um eine stärkere Anreicherung zu erzielen. In Runde 3 wurde eine Doppelmarkierung (Myc-Epitop und Antigen-Markierung) durchgeführt und die Region 1 mit Berücksichtigung des Fluoreszenzkanals FL1 gelegt (Abbildung 37).

Vor Runde 4 der Durchmusterung wurde zusätzlich kontrolliert, ob SAPE-bindende Hefezellen angereichert wurden, da SAPE in allen Sortierungsrunden zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurde. Etwa  $10^6$  Hefezellen der induzierten Kultur wurden für eine Markierung eingesetzt (3.8.1), bei der kein hC4bp-Antigen, sondern ausschließlich SAPE in gleicher Konzentration (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) wie in den Sortierungsmarkierungen eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 dargestellt.

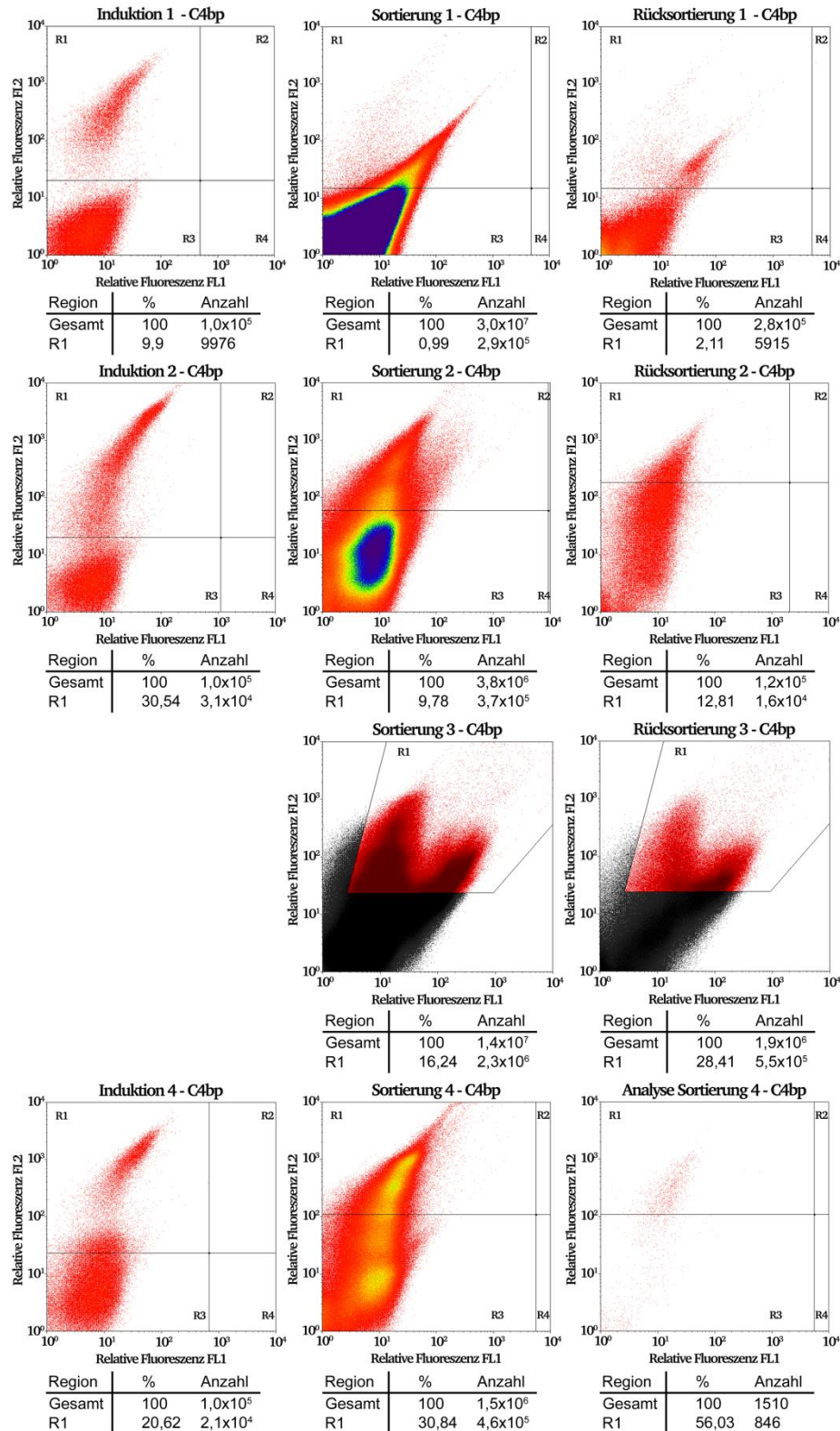


Abbildung 37: Daten der FACS gestützten Durchmusterung der VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen humanes C4bp. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Sortierungsrunden sind waagrecht untereinander angeordnet. An Position 1 jeder Reihe sind die Myc-Epitop-Markierungen, an Position 2 die Sortierungen und an Position 3 die Rücksortierungen (bzw. Analyse, Runde 4) dargestellt. Region R1 kennzeichnet in allen Sortierungen und Rücksortierungen die Region der aussortierten Hefezellen. Die Gesamtzellzahlen und Prozentangaben sind unter dem dazugehörigen Dotplot angegeben.

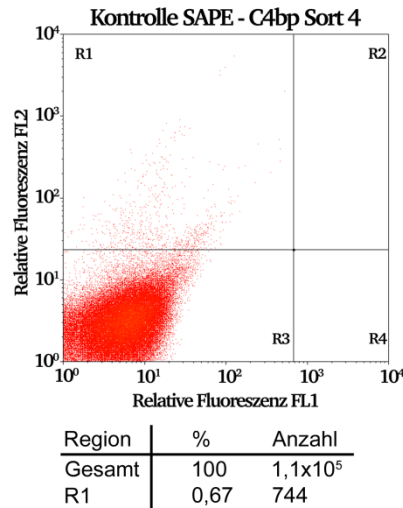


Abbildung 38: Negativkontrolle der Hefepopulation vor Runde 4 der Durchmusterung der VHH-Bibliothek in Hefen gegen SAPE. Die Markierung wurde äquivalent zu denen der Sortierungsmarkierungen durchgeführt, lediglich der Markierungsschritt mit hC4bp wurde ausgeschlossen. Dargestellt ist ein zweidimensionaler Dotplot mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Region R1 wurde identisch zu der in Runde 4 der Durchmusterung gesetzt. Die Gesamtzellzahlen und Prozentangaben sind unter dem Dotplot angegeben.

#### 4.1.9.2 Durchflusszytometrische Analyse von Einzelklonen der Durchmusterung gegen hC4bp

Zur Analyse von Einzelklonen wurden fünf Einzelklone von einer Verdünnungsplatte der letzten Runde (Runde 4, Abbildung 37) der Durchmusterung gegen hC4bp (4.1.9.1) kultiviert und die Oberflächenexpression induziert (3.2.2). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden alle Einzelklone zunächst sowohl auf ihre Oberflächenexpression als auch auf ihre potentielle Bindung gegen SAPE analysiert. Je etwa  $10^6$  Hefezellen wurden wie unter 3.8.1 beschrieben markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (3.8.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

Alle Klone zeigen zunächst nur eine geringe Zugänglichkeit des Myc-Epitops (Abbildung 39, R1). Lediglich eine kleine Population mit niedriger Signalstärke liegt in der Region R1. Die Negativkontrolle gegen SAPE zeigt bei allen fünf Klonen kein Signal (Abbildung 39, R3). Jedoch zeigt die Antigenmarkierung mit hC4bp bei allen Einzelklonen ein starkes Signal mit einem Anteil von über 50 % in Region R2 (Abbildung 39).



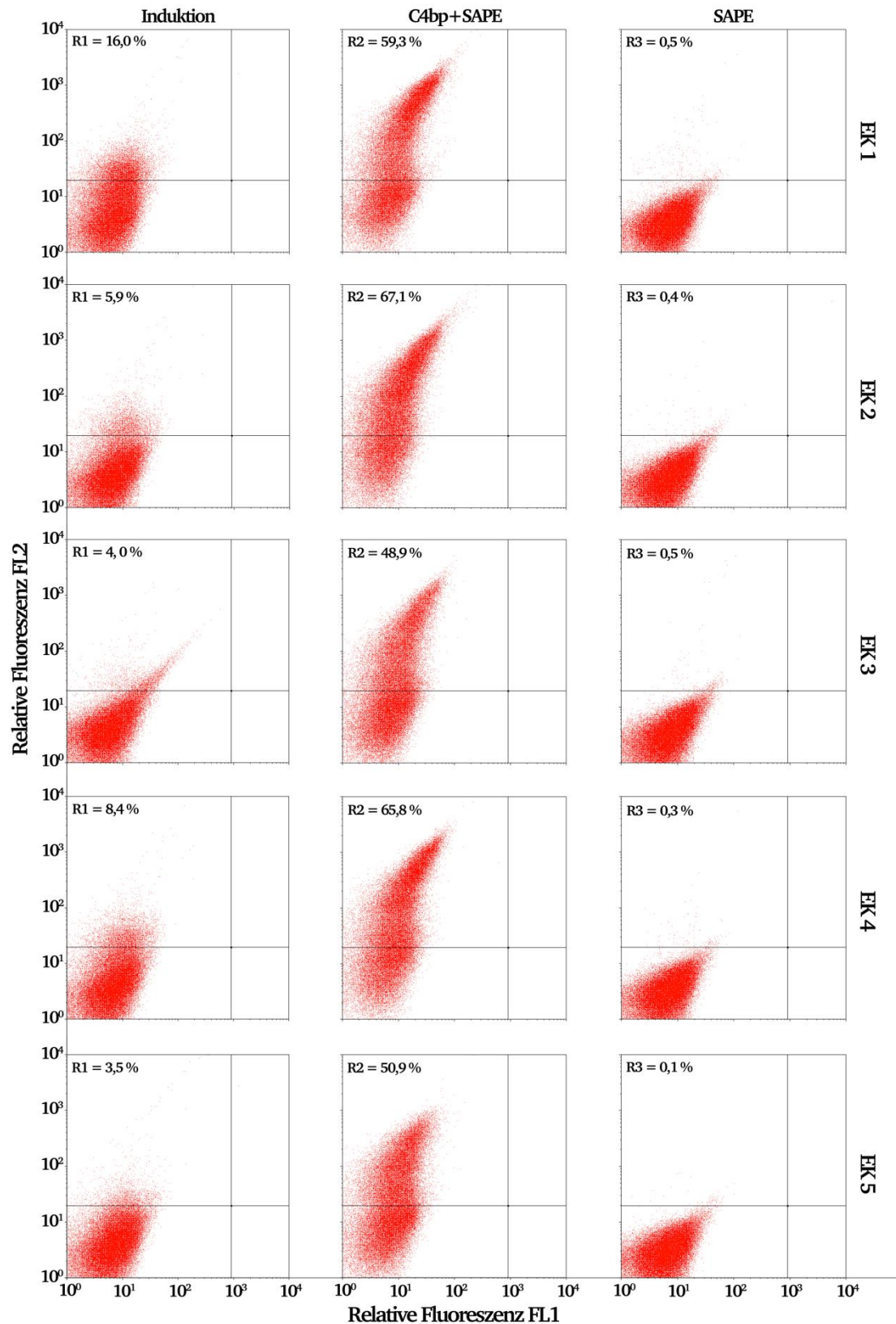


Abbildung 39: Einzelklonanalysen (1-5) der Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach hC4bp bindenden Hefezellen. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Alle Einzelklone wurden auf folgende Eigenschaften getestet: Zugänglichkeit des Myc-Epitops (R1, Spalte 1). Bindung des Antigens hC4bp (R2, Spalte 2). Bindung von SAPE (R3, Spalte 3) als Negativkontrolle.

#### 4.1.9.3 Diskussion

Bei der Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach hC4bp bindenden Hefezellen wurden vier Sortierungsrunden mit biotinyliertem Antigen und SAPE als Fluoreszenzmarker durchgeführt (4.1.9.1). Dabei konnte die teilweise Zugänglichkeit des Myc-Epitops in der Gesamtdiversität der VHH-Bibliothek bestätigt werden (Abbildung 37, 9,9 %). Die Anreicherung war von Runde 1 zu Runde 2 schon sichtbar effektiv, wobei das Fluoreszenzsignal im Fluoreszenzkanal FL2 von etwa 1 % auf 41 % gesteigert werden konnte (Abbildung 37, Sortierung 1 und 2). Die Anreicherung wurde durch ein stringenteres Sortierungskriterium (Region R1) begünstigt und wurde bis Runde 4 weiter gesteigert (Abbildung 37). Eine im Anschluss an Runde 4 durchgeführte Negativkontrolle gegen den Fluoreszenzmarker SAPE zeigte kein auffälliges Signal (Abbildung 38). Trotz der Tatsache, dass schon in Runde 2 eine große, abgetrennte Population an Bindern vorhanden war, wurde die Durchmusterung zu Zwecken der Evaluation bis Runde 4 weiter fortgeführt. Im Anschluss daran wurden fünf Einzelklone analysiert. Diese wurden zunächst auf ihre Oberflächenpräsentation durch Markierung des Myc-Epitops getestet (Abbildung 39, erste Spalte) und anschließend wieder auf eine unerwünschte Bindung von SAPE (Abbildung 39, dritte Spalte). Die Myc-Epitop Markierung zeigte bei allen fünf Klonen ein nur schwaches Signal. Der Grund könnte eine niedrige Expressionsrate und somit eine geringe Beladung der Oberfläche mit Myc-VHH-Aga2-Fusionsprotein sein. Auch denkbar wäre eine räumliche Hinderung und somit eine schlechte Zugänglichkeit des Myc-Epitops. In Sortierungsrunde 4 sind in der Analyse der Myc-Markierung deutlich zwei Populationen positiv markierter Zellen zu erkennen (Abbildung 37, Induktion Runde 4). Eine Population mit starkem Signal bei etwa  $10^3$  rfu (FL2) und eine mit schwachem Signal bei etwa  $2 \times 10^1$  rfu (FL2). Eine Diskriminierung dieser beiden Populationen durch gleichzeitige Markierung von Antigen und Myc-Epitop in Kombination mit einem deutlich stringenteren Sortierungskriterium würde eine Anreicherung von Hefeklonen mit diesen Eigenschaften potentiell stark begünstigen. Die Antigenmarkierung mit hC4bp<sub>Biotin</sub> zeigte im Gegensatz zur Myc-Markierung jedoch ein starkes Signal (Abbildung 39, zweite Spalte) und bestätigte ebenfalls den Erfolg der Anreicherung. Die Daten dieser Durchmusterung zeigen, dass die Isolierung von Antigen bindenden Hefezellen generell möglich ist.

#### 4.1.9.4 Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Bindern gegen Saglin aus *Anopheles spec.*

Die Anreicherung und Isolierung von Hefezellen aus der VHH-Bibliothek gegen Saglin wurde ebenfalls im FACS durchgeführt. Die Antigenmarkierung erfolgte auch hier durch SAPE und vorheriges Biotinylieren des Antigens (3.5.7). Da in einem vorangegangenen Durchmusterungsdurchlauf große Populationen an SAPE bindenden Hefezellen angereichert wurden (Daten nicht gezeigt), bediente man sich in dieser Durchmusterung zusätzlich der magnetischen Sortierung zur Abreicherung SAPE bindender Hefezellen. Vor Runde 2 und 3 wurden die zu durchmusternden Hefezellen zunächst nach Angaben in 3.8.5 mit Streptavidin gekoppelten *dynabeads*<sup>®</sup> (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) inkubiert und anschließend im Magnetständer aus dem Hefegemisch entfernt. Danach wurde wie gewohnt die Oberflächenexpression durch Analyse des Myc-Epitops überprüft und eine Antigenmarkierung mit 500 nM biotinyliertem Saglin durchgeführt (3.8.1) sowie durchflusszytometrisch durchgemustert (3.8.2). Wieder wurden direkt nach den Sortierungen Rücksortierungen durchgeführt und die Stringenz des Sortierungskriteriums (Region R1) erhöht. Die Negativkontrollen wurden vor der Abreicherung und Durchmusterung in den Runden 2 und 3 mit SAPE (100 µg/ml) durchgeführt (3.8.1, 3.8.2).

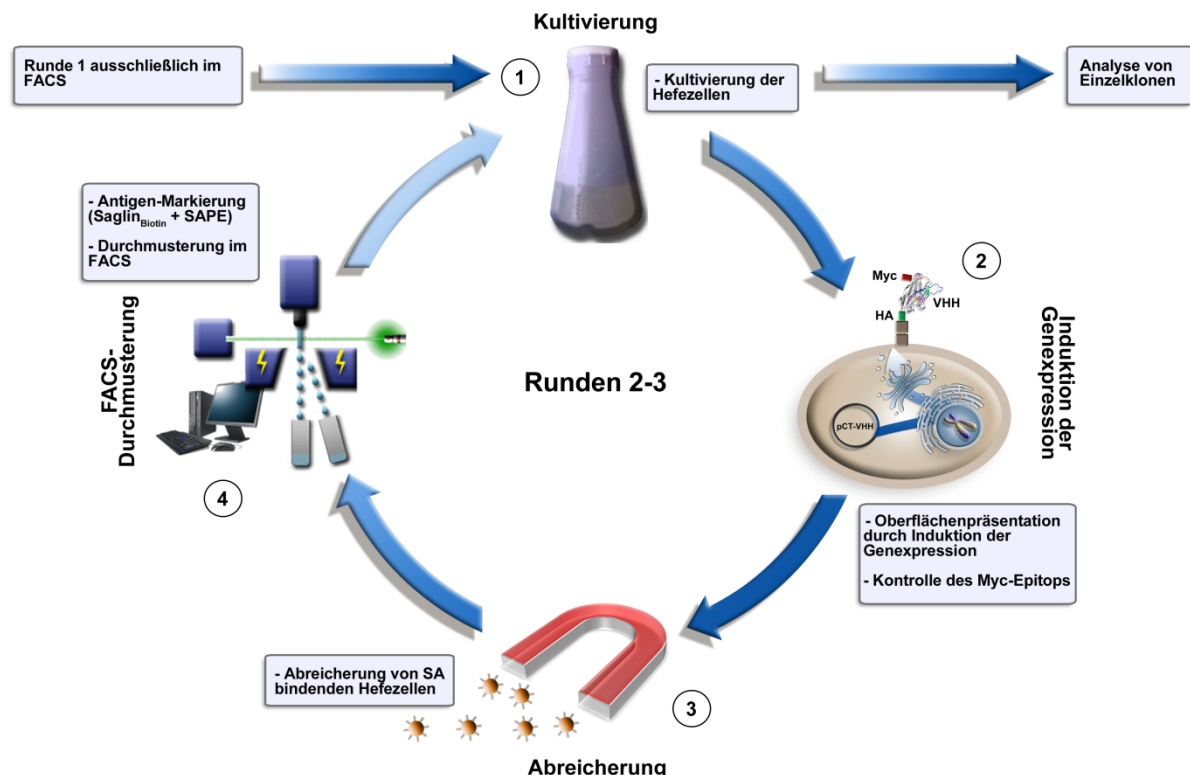


Abbildung 40: Strategie für die Durchmusterung der VHH-Bibliothek in Hefen nach Saglin bindenden Zellen. Die erste Runde wurde wie zuvor ausschließlich im FACS durchgeführt. Die Runden 2 und 3 wurden nach einem modifizierten Schema durchgeführt. Kultivierung der Hefezelle (1). Induktion der Oberflächenexpression und anschließende Kontrolle des Myc-Epitops (2). Abreicherung von Streptavidin bindenden Hefezellen mittels *dynabeads* und MACS (3). Antigenmarkierung (Saglin<sub>Biotin</sub> + SAPE) und Durchmusterung im FACS (4). Nach Runde 4 wurden Einzelklone analysiert.

Für die Durchmusterung wurde zunächst wieder ein Aliquot der VHH-Bibliothek aufgetaut (4.1.6.2) und nach Angaben unter 3.2.2 kultiviert, passagiert und anschließend die Genexpression induziert. Bei der Induktion wurde dem SG-Medium 10 % (w/v) Polyethylenglycol ( $M_w = 8.000 \text{ g/mol}$ ) zugegeben (3.2.2), wodurch eine erhöhte Expressionseffizienz erzielt werden sollte <sup>[204]–[206]</sup>. Außerdem wurde die Kultur für die Genexpression für etwa 72 Std stehend (0 U/min) gelagert (3.2.2) und nicht wie zuvor bei 200 U/min geschüttelt.

Die Analysen des Myc-Epitops zeigen in allen drei Runden einen hohen Anteil an fluoreszenzmarkierten Hefezellen mit einem starken Signal (Abbildung 41, Spalte 1). Im Vergleich mit der Myc-Epitop-Analyse der Durchmusterung nach C4bp bindenden Hefezellen (Abbildung 37), in der kein Polyethylenglycol im Induktionsmedium verwendet wurde, liegt hier eine Steigerung des prozentualen Anteils von etwa 10 % auf 40 % in der jeweils ersten Runde vor. Bei der Durchmusterung konnte bereits nach einer Runde eine Anreicherung von zunächst 1 % positiv markierten Hefezellen auf etwa 50 % erreicht werden (Abbildung 41, Spalte 2). Die Stringenz wurde in Runde 2 bereits erhöht, eine weitere Anreicherung war jedoch kaum noch möglich (Abbildung 41, Spalten 2 und 3).

Die Kontrolle der Bindung von SAPE vor Runde 2 zeigte eine Population von etwa 8 % positiv markierter Hefezellen (Abbildung 42), die in Runde 1 angereichert wurden. Vor der anschließenden Durchmusterung (Runde 2) wurde die Abreicherung mit Streptavidin beladenen *dynabeads* durchgeführt (3.8.5). Die Kontrolle der SAPE-Bindung vor Runde 3 zeigt, dass der Anteil an positiven Zellen auf lediglich 14 % angereichert wurde (Abbildung 42). Vor der Durchmusterung in Runde 3 wurde ebenfalls eine Abreicherung (3.8.5) durchgeführt.

Nach der vollständigen Durchmusterung wurden zehn Einzelklone von SD(-Trp)-Agar (2.9.2) für eine anschließende durchflusszytometrische Analyse wie unter 3.2.2 beschrieben kultiviert und die Genexpression induziert. Alle Einzelklone wurden dann zunächst auf die Bindung von SAPE untersucht (3.8.1). Anschließend wurden alle Einzelklone, die kein Signal bei der Negativkontrolle aufwiesen, auf die Bindung von Saglin überprüft (3.8.1). Dabei wurde die gleiche Antigenkonzentration (500 nM Saglin<sub>Biotin</sub>) verwendet wie bei der vorangegangenen Durchmusterung. Drei der Einzelklone (2, 3 und 5) wurden ebenfalls mit einer höheren Konzentration an Saglin (2  $\mu\text{M}$ ) markiert, um das Fluoreszenzsignal zu verstärken (3.8.1).



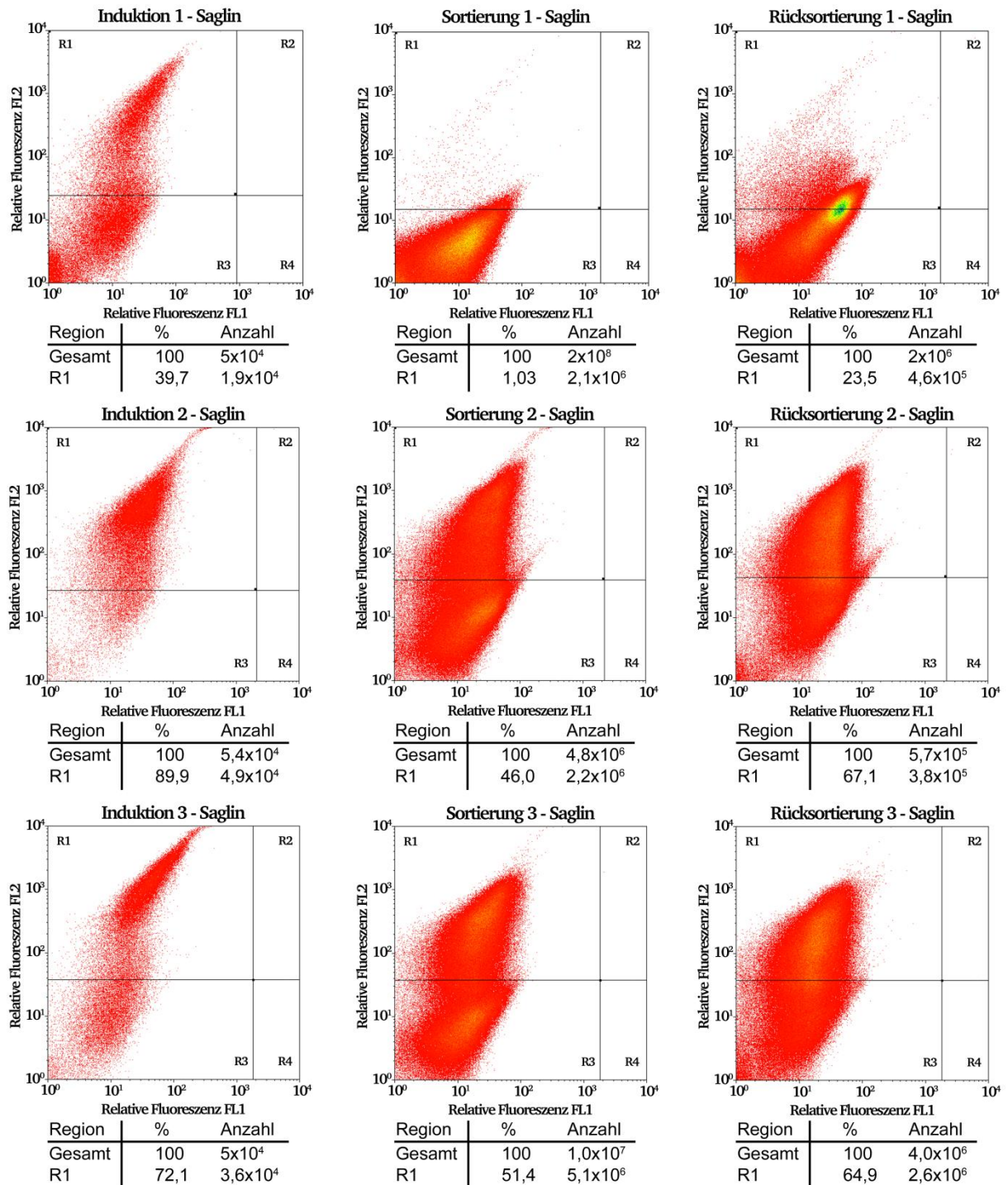


Abbildung 41: Daten der FACS gestützten Durchmusterung der VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen Saglin. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Sortierungsrunden sind waagrecht untereinander angeordnet. An Position 1 jeder Reihe sind die Myc-Epitop-Markierungen, an Position 2 die Sortierungen und an Position 3 die Rücksortierungen dargestellt. Region R1 kennzeichnet in allen Sortierungen und Rücksortierungen die Region der aussortierten Hefezellen, in den Myc-Epitop Analysen die Population der positiv markierten Zellen. Die Gesamtzellzahlen und Prozentangaben sind unter dem dazugehörigen Dotplot angegeben.

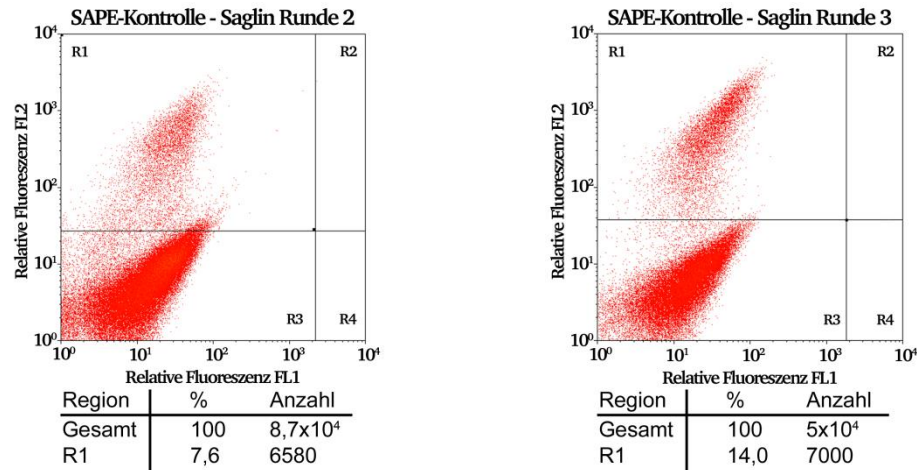


Abbildung 42: Negativkontrollen der Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Saglin bindenden Hefezellen. Analysiert wurde der Anteil an SAPE bindenden Hefezellen vor Runde 2 und 3 der Durchmusterung. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse).

Die Analyse der Einzelklone auf die Bindung von SAPE zeigte, dass trotz Abreicherungen vier von zehn Klonen (Einzelklone 4, 7, 9 und 10) ungewünschte Bindeeigenschaften gegen SAPE aufwiesen (Abbildung 43). Die restlichen Klone (Einzelklone 1, 2, 3, 5, 6 und 8) konnten anschließend alle erfolgreich mit biotinyliertem Saglin und SAPE fluoreszenzmarkiert werden (Abbildung 44, Reihe 1-2). Die Fluoreszenzsignale zeigten dabei nur leichte Unterschiede in ihrer Intensität. Bei den Einzelklonen mit den höchsten Anteilen an positiven Ereignissen in Region R1 (Einzelklone 2,3 und 5) konnte anschließend, durch Verwendung einer höheren Antigen-Konzentration ( $2 \mu\text{M}$  Saglin), eine Intensivierung des Fluoreszenzsignals erreicht werden (Abbildung 44, Reihe 3). Die Einzelklone 3 und 5 wurden im Anschluss verwendet, um die Aminosäuresequenzen zu analysieren sowie die Bindeeigenschaften auf der Hefefläche zu bestimmen.

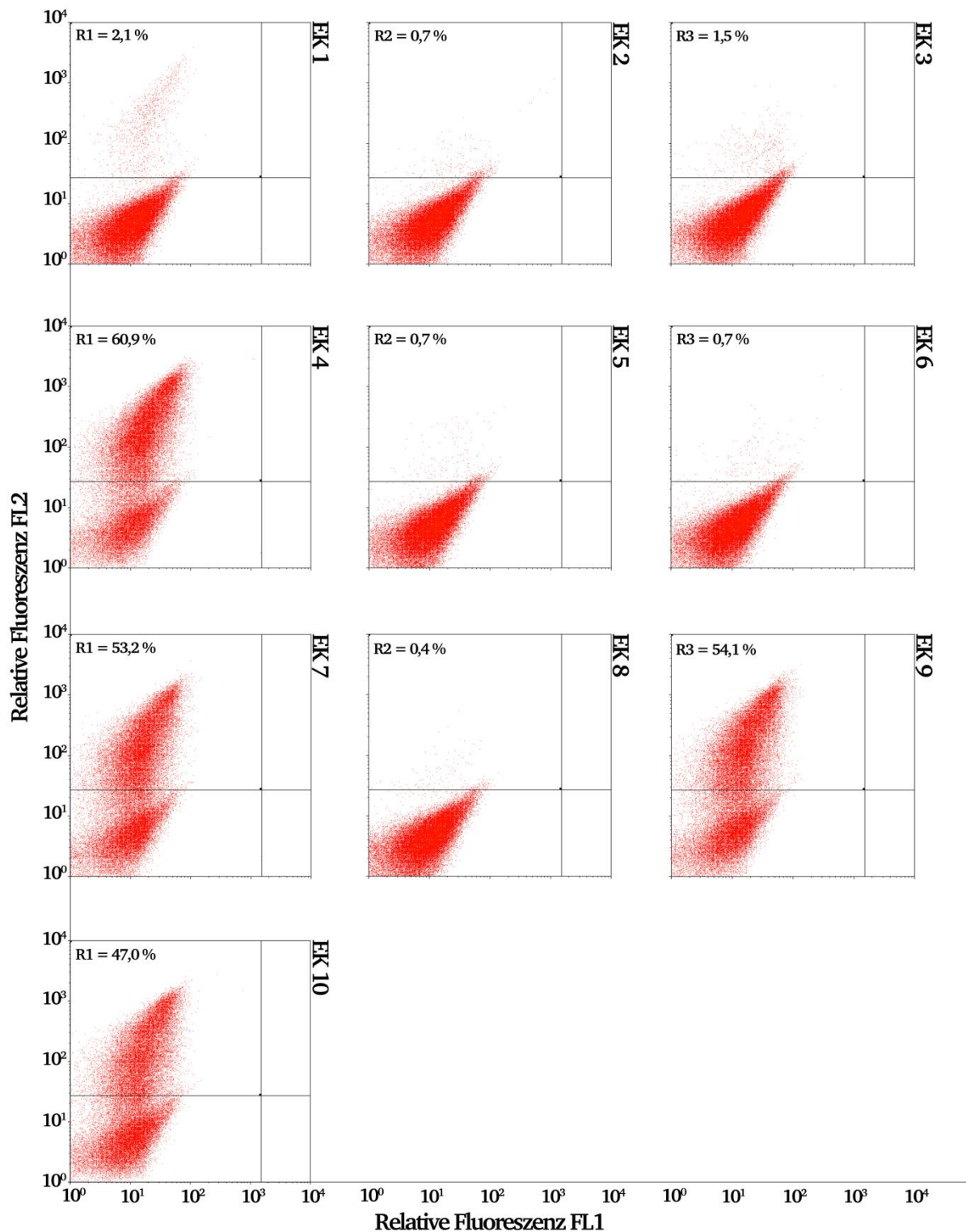


Abbildung 43: Daten der Negativkontrolle der zehn Einzelklone gegen SAPE (100  $\mu\text{g/ml}$ ) aus der Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Saglin bindenden Hefezellen. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Der Anteil an positiv markierten Hefezellen (Region R1, R2 oder R3) ist im jeweiligen Dotplot angegeben.

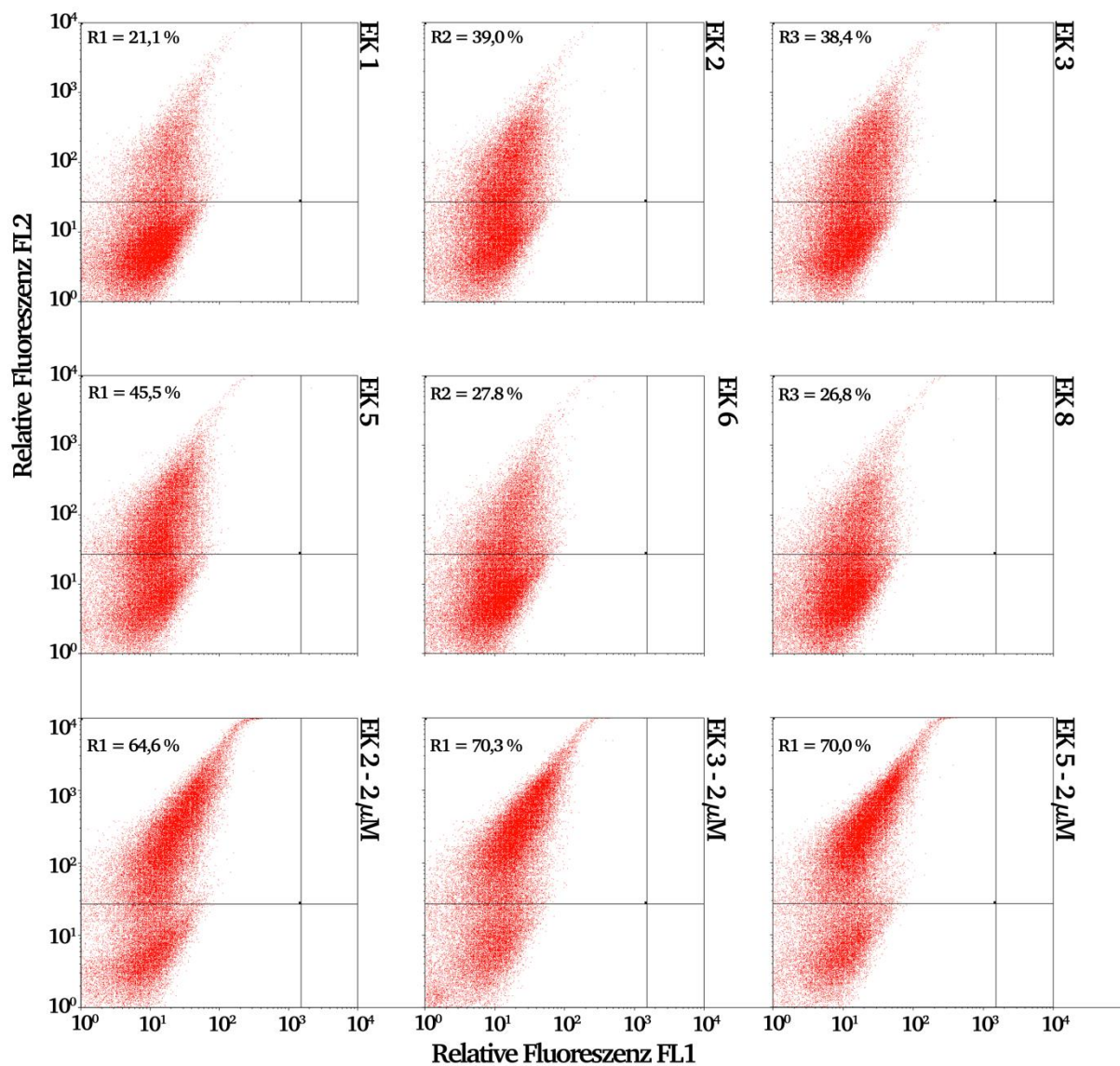


Abbildung 44: Daten der Einzelklonanalyse der zehn Einzelklone gegen Saglin aus der vorangegangenen Durchmusterung. Analysiert wurden nur die Klone, welche zuvor keine Bindung gegen SAPE zeigten (Abbildung 42). Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Der Anteil an positiv markierten Hefezellen (Region R1, R2 oder R3) ist im jeweiligen Dotplot angegeben. In den oberen beiden Reihen ist die Markierung mit 500 nM Saglin (EK1, 2, 3, 5, 6 und 8), in der letzten Reihe die Markierung ausgewählter Klone mit 2  $\mu$ M Saglin dargestellt.

#### 4.1.9.5 Vertiefung der Analyse der Saglin-Einzelklone 3 und 5

Für eine Sequenzanalyse wurden die VHH-Sequenzen der Einzelklone 3 und 5 zunächst über eine Kolonie-PCR (3.4.4) amplifiziert und in einen geeigneten *E. coli* Vektor kloniert. Die dabei verwendeten Oligonukleotide pEX\_LVHH\_SfiI\_NheI\_up und pEX\_LVHH\_-SfiI\_BamHI\_lo (Tabelle 3) ermöglichten eine Amplifizierung der VHH-Sequenz inklusive der Schnittstellen



*NheI* und *BamHI* am N- bzw. C-Terminus und fügten gleichzeitig *SfiI*-Schnittstellen für eine anschließende Klonierung in den Vektor pEXdsbaMCoTI (vergleiche 2.5.3) an. Dieser Vektor besitzt anstatt der *pelB*-Signalsequenz eine *dsba*-Signalsequenz und trägt als Platzhalter zwischen den *SfiI*-Schnittstellen das Gen für McoTI. Bei der Kolonie-PCR wurden die restlichen zuvor positiv getesteten Einzelklone (1, 2, 6 und 8; Abbildung 44) ebenfalls für eine Amplifikation eingesetzt, um zu überprüfen, ob die VHH-DNA hier ebenfalls in der Klonierungsstelle integriert wurde.

Die Amplifikation der VHH-DNA sowie die Gelextraktion zur Trennung des linearisierten Vektors von der McoTI-DNA (3.3.6) nach Restriktion mit *SfiI* (3.4.1) sind in Abbildung 45 dargestellt. Die VHH-DNA wurde nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.3.2) und anschließenden Fällung (3.3.3) ebenfalls mit *SfiI* geschnitten und erneut gereinigt (3.3.2, 3.3.3). Der linearisierte Vektor sowie die VHH-DNA der beiden Klone 3 und 5 wurden anschließend für eine Ligation eingesetzt (3.4.2) sowie *E. coli* TOP10 direkt mit dem Ligationsprodukt transformiert (3.1.4). Je acht Klone von der Agarplatte wurden anschließend kultiviert (3.1.2) und mittels Kolonie-PCR (3.4.4) unter Verwendung der Oligonukleotiden M13-reverse sowie pEX\_LVHH\_SfiI\_BamHI\_lo (Tabelle 3) die Integration des VHH-Gens kontrolliert. Von je zwei Klonen mit richtiger Bandenlänge wurde die Plasmid-DNA isoliert (3.3.7.1). Die DNA wurde für eine Sequenzierung mit dem Oligonukleotid M13\_reverse (Tabelle 3) eingesetzt.

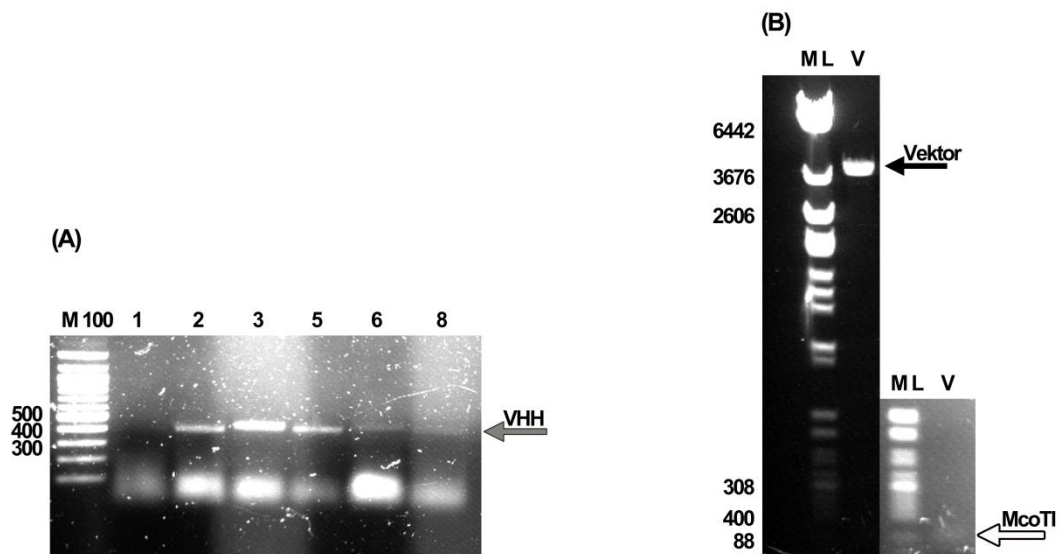
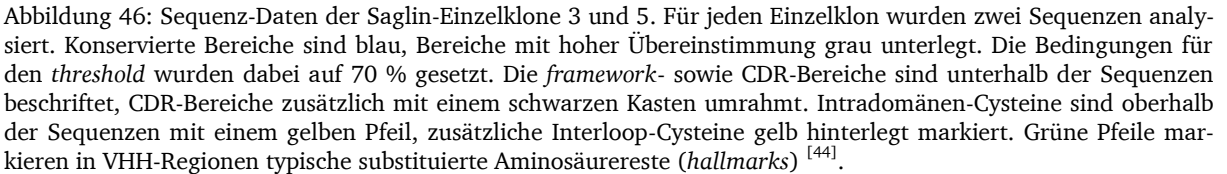


Abbildung 45: Agarosegelelektrophorese der Hefe-Kolonie-PCR mit den Saglin-Einzelklonen 1, 2, 3, 5, 6 und 8 (A) und der Gelextraktion des Vektors pEXdsbaMCoTI nach Restriktion mit *SfiI* (B). Die Spuren der jeweiligen VHH-Einzelklone sind mit 1, 2, 3, 5, 6 und 8 beschriftet (A), die Spur des Vektors mit V (B). Die VHH-Banden (~400 bp) sind mit einem grauen Pfeil markiert, die Banden für den linearisierten Vektor (~3.800 bp) mit einem schwarzen Pfeil. Die Bande des geschnittenen McoTI-Fragments (~100 bp) ist im überbelichteten Ausschnitt (B, rechts) mit einem weißen Pfeil markiert. Die Bande des linearisierten Vektors wurde aus dem Gelextrahiert. M 100 = 100 bp DNA Ladder (NEB). ML = Lambda DNA/Eco47I (Avall), 13 Marker (Fermentas). Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.



---

---

$5 \times 10^4$  Ereignisse gemessen (Abbildung 47). Anhand der *mean* Werte wurde eine  $K_D$  von etwa  $5 \mu\text{M}$  berechnet.

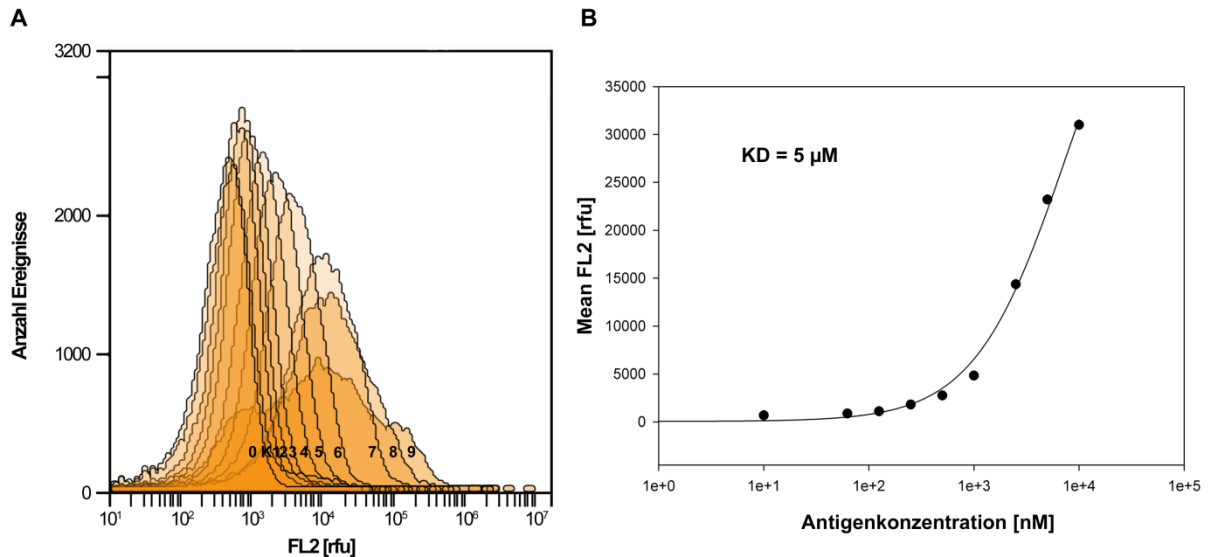


Abbildung 47: Daten der durchflusszytometrischen Analyse für die Titration auf Hefezellen zur Ermittlung der Affinitätskonstante des VHH-Antikörpers Saglin-Einzelklon 3. 12 Aliquots wurden mit ansteigender Konzentration an Saglin-TRX<sub>Biotin</sub> sowie SAPE markiert und gemessen. Dargestellt ist ein *overlay* aller Einzelmessungen zusammengefasst in einem Histogramm (A). Die X-Achse zeigt das Fluoreszenzsignal des PE-Signals (FL2), die Y-Achse die Anzahl der Ereignisse. 0=unmarkierte Hefezellen, K=nur SAPE, 1=10 nM Saglin, 2=62,5 nM Saglin, 3=125 nM Saglin, 4=250 nM Saglin, 5=500 nM Saglin, 6=1.000 nM Saglin, 7=2.500 nM Saglin, 8=5.000 nM Saglin und 9=10.000 nM Saglin. Die gemessenen *Mean* Werte des FL2-Signals (PE) wurden anschließend gegen die Antigenkonzentration sowie die daraus berechnete Regressionsgerade aufgetragen (B). Die errechnete Affinitätskonstante ( $K_D$ ) ist in der Abbildung angegeben.

#### 4.1.9.7 Diskussion

In der zweiten Durchmusterung der VHH-Bibliothek sollten Binder gegen Saglin isoliert werden (4.1.9.4). Eine vorangegangene Durchmusterung gegen Saglin machte deutlich, dass potentiell Binder gegen den Fluoreszenzmarker angereichert werden können (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde hier eine Abreicherung mit magnetischen *dynabeads* versucht, die mit Streptavidin beladen waren (Abbildung 40). Die Negativkontrollen mit SAPE vor Runde 2 und 3 zeigen kleine Populationen mit starkem Fluoreszenzsignal (Abbildung 42). Auch die anschließende Einzelklonanalyse, in der vier von zehn Klone deutliche Bindeeigenschaften gegenüber SAPE aufwiesen (Abbildung 43), machte die Dringlichkeit einer Abreicherung deutlich. Die Durchmusterung erwies sich, wie im Falle der vorangegangenen Sortierung gegen hC4bp, wieder als sehr effektiv (Abbildung 41). Von Runde 1 auf Runde 2 wurde bereits eine Anreicherung von 1 % auf 50 % beobachtet. Das Sortierungskriterium wurde auch hier in Runde 2 stringenter gesetzt. Von Runde 2 (Abbildung 41, Sortierung 2) auf Runde 3 (Abbildung 41, Sortierung 3) konnte erneut eine leichte Steigerung der Anreicherung von

46,0 % auf 51,4 % beobachtet werden. Die Induktion der Genexpression wurde während dieser Durchmusterung mit Zugabe von Polyethylenglycol (PEG<sub>8000</sub>) durchgeführt, um die Expressionsrate zu steigern <sup>[208]</sup>. Im Vergleich zur Myc-Markierung der ersten Runde der Durchmusterung gegen hC4bp (Abbildung 37), wo ein Anteil von 9,9 % positiv markierter Zellen gemessen wurde, konnte diese hier auf 40 % gesteigert werden (Abbildung 41). Diese starke Verbesserung bedeutet einen geringeren Verlust von potentiellen Bindern, die aufgrund ausbleibender Oberflächenpräsentation der VHH-AK nicht aussortiert werden würden. Außerdem reduziert dies die zu durchmusternde Gesamtzellzahl, da man bei deutlich geringeren Expressionsraten diese durch ein höheres *oversampling* ausgleichen müsste. Die Stringenz bei der Festlegung des Sortierungskriteriums wurde auch hier nicht ausgereizt. Zwar wurde sie in der zweiten Runde erhöht (Abbildung 41), jedoch zeigte die Antigenmarkierung der Einzelklone ein eher moderates Fluoreszenzsignal, das erst mit vierfacher Antigenkonzentration deutlich vom Signal der Negativpopulation getrennt werden konnte (Abbildung 44). Die unter 4.1.9.6 beschriebene Titrierung des Einzelklons 3 (Abbildung 47) erbrachte einen berechneten  $K_D$ -Wert von etwa 5.000 nM und bestätigte die Fluoreszenzanalyse (Abbildung 44). Die Sequenzanalyse, nach Klonierung der VHH-DNA in den *E. coli* Vektor pEX (4.1.9.5), wies vier korrekte VHH-Sequenzen nach, wobei im Falle der beiden Sequenzen aus Hefeklon 5 unterschiedliche DNA-Sequenzen hervorgingen (Abbildung 46). Dies spricht dafür, dass Einzelklon 5 eventuell ein Gemisch aus mindestens zwei unterschiedlichen Klonen darstellt. Dies könnte sowohl durch unvollständiges Vereinzeln und Picken der Kolonien, als auch schon bei der Transformation der Hefezellen durch einschleusen mehrerer Vektoren und VHH-Fragmente in eine Hefezelle geschehen sein.

#### 4.1.9.8 Durchmusterung der naiven VHH-Bibliothek nach Bindern gegen humanes P-Cadherin

Als drittes Projekt soll nachfolgend die Durchmusterung der naiven VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindemolekülen gegen humanes P-Cadherin beschrieben werden. Dieses Projekt wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Haberkorn (DKFZ Heidelberg) durch Zurverfügungstellung von Antigen unterstützt. In diesem Projekt sollten alternative Bindemoleküle gegen das humane P-Cadherin für die Initialisierung einer Medikamentenentwicklung gefunden werden. Hier wurden unter anderem VHH-Antikörper in Betracht gezogen, da diese Klasse von Schwerkettenantikörper aufgrund ihrer Stabilität und geringen Größe eine geeignete Alternative zu volllängen IgGs darstellen (vergleiche 1.3). Des Weiteren war die Durchmusterung einer bereits bestehenden naiven Bibliothek eine deutlich kostengünstigere und weniger aufwändige Strategie als die Immunisierung eines Lamas.

Bezüglich der Durchmusterungsstrategie sollten diesmal zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarker zum Einsatz kommen. Das Antigen P-Cadherin wurde von der Fa. R&D-Systems bezogen und besaß ein His-Epitop. Deshalb wurde neben der bisherigen SAPE-Markierung ein Penta-His-AlexaFluor488 Konjugat als Fluoreszenzmarker eingesetzt. Wie in der Durchmusterung gegen Saglin bereits gezeigt wurde, können ungewollt Binder gegen den Fluoreszenzmarker SAPE angereichert werden. In zwei weiteren vorangegangenen Durchmusterungen gegen P-Cadherin und CD276 (B7-H3) wurden ebenfalls Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat bindende Hefezellen angereichert (Daten nicht gezeigt). Um eine solche unerwünschte Anreicherung zu vermeiden, sollten beide Fluoreszenzmarker alternierend eingesetzt werden. Wie zuvor in der Durchmusterung gegen Saglin (4.1.9.4), wurde auch in dieser Durchmusterung dem Induktionsmedium 10 % (w/v) PEG<sub>8000</sub> zugegeben (3.2.2).

Für die initiale Durchmusterung der gesamten VHH-Bibliothek, wurde erneut ein Aliquot aufgetaut (Kryokultur; -80 °C) und, wie unter 3.2.2 beschrieben, zunächst kultiviert sowie anschließend die Genexpression für die Oberflächenpräsentation der VHH-Antikörper induziert. Vor der Durchmusterung wurde zunächst die Zugänglichkeit des Myc-Epitops analysiert (3.8.1). Abbildung 48 zeigt die durchflusszytometrische Analyse (3.8.2) mit einem Anteil von etwa 23 % positiv markierten Hefezellen. Im Anschluss wurden etwa  $1 \times 10^8$  Hefezellen für die Antigenmarkierung eingesetzt (3.8.1). Erneut wurde eine Antigenkonzentration von 500 nM für alle vier Runden verwendet. Die anschließende Fluoreszenzmarkierung erfolgte in Runde eins der Durchmusterung mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat (10 µg/ml in PBS; Tabelle 4). Insgesamt wurden vier Runden durchmustert, wobei in Runde zwei anstelle des Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugats biotinyliertes P-Cadherin und SAPE (20 µg/ml PBS) für die Fluoreszenzmarkierung verwendet wurden (Abbildung 49). Nach jeder Sortierung wurde eine Rücksortierung durchgeführt. Das Sortierungskriterium wurde diesmal mit den Regionen R1 (bei Markierungen mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat, FL1) und R2 (bei Markierung mit SAPE, FL2) polygonal im Dotplot gesetzt, um die gewünschten Populationen besser isolieren zu können (Abbildung 49). Vor Runde zwei bis vier wurden die Zellen zunächst unbehandelt im FACS betrachtet und anschließend zum einen die Myc-Markierung, zum anderen die uner-

wünschte Anreicherung von Bindern gegen die beiden Fluoreszenzmarker Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat und SAPE analysiert (Abbildung 50). Die Analysen des Myc-Epitops zeigen, dass der Anteil an positiv markierten Zellen von anfangs etwa 23 % (Abbildung 48) bis auf etwa 68 % (Abbildung 50) gesteigert wurde. Eine Anreicherung an P-Cadherin bindenden Hefezellen konnte ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 49). Die noch in Runde eins etwa 1 % (Sortierung) bzw. 24 % (Rücksortierung) positiv markierte Zellen umfassende Population konnte bis in Runde vier auf 6 % (Sortierung) bzw. 50 % (Rücksortierung) angereichert werden. Die Kontrollen mit SAPE und Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat (Abbildung 50, Spalte 3 und 4) zeigen, dass in Runde vier keine entsprechende prominente Population markierter Zellen vorhanden ist. Lediglich in Runde zwei, in der SAPE als Fluoreszenzmarker verwendet wurde, sind entsprechende unerwünschte Binder angereichert worden, die in der Kontrollmarkierung vor Runde drei einen Anteil von etwa 31 % ausmachen (Abbildung 50, Spalte 3, Runde 3). Durch den Wechsel von SAPE zu Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat als Fluoreszenzmarker konnte dieser Anteil auf 0,6 % reduziert werden (Abbildung 50, Spalte 3 Runde 4). Eine Anreicherung an Bindern gegen Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat ist lediglich in der Kontrolle vor Runde vier in Form einer sehr kleinen Population (<1 %) zu erkennen (Abbildung 50, Spalte 4 Runde 4).

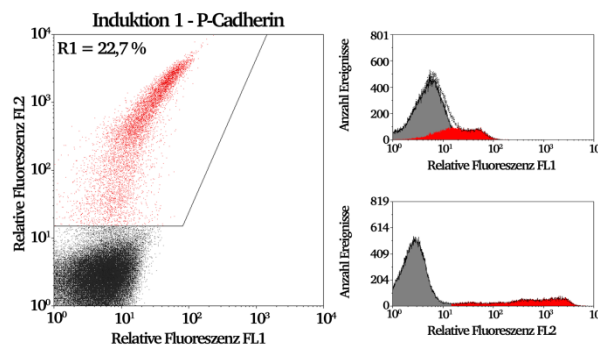


Abbildung 48: Daten der Myc-Markierung aus Runde 1 der Durchmusterung gegen P-Cadherin. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Region R1 kennzeichnet die Population der positiv markierten Zellen. Daneben sind zusätzlich die beiden Signale der Fluoreszenzkanäle FL1 und FL2 als Histogramme mit den Populationen der Ereignisse aus Region R1 (rot) dargestellt.



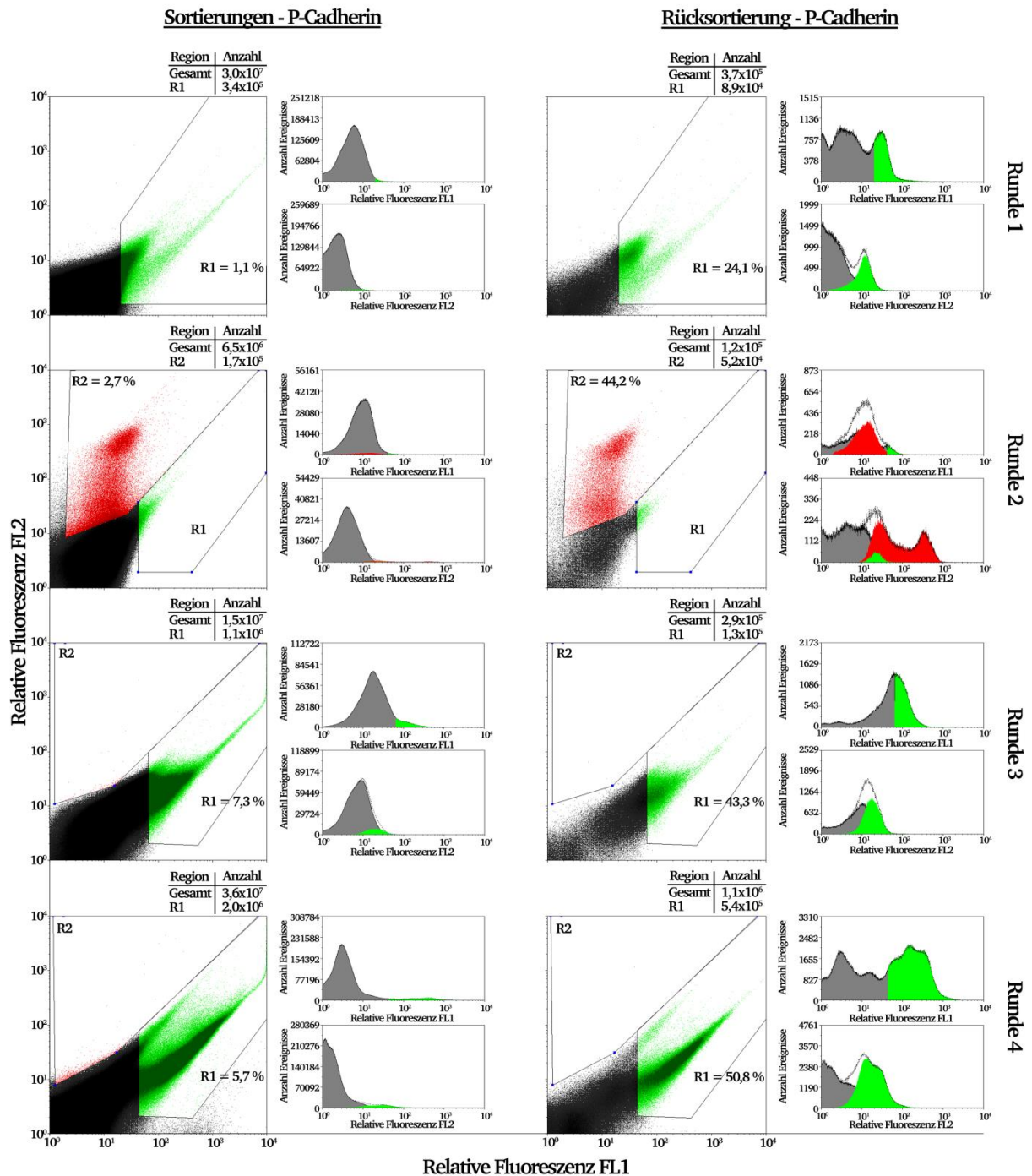


Abbildung 49: Daten der FACS gestützten Durchmusterung der VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen humanes P-Cadherin. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Außerdem sind die Signale der beiden Fluoreszenzkanäle FL1 und FL2 als Histogramm mit den Populationen der beiden Regionen R1 (grün) und R2 (rot) aus dem jeweiligen Dotplot dargestellt. Die Sortierundrunden sind waagerecht untereinander angeordnet. In Spalte 1 sind die Sortierungen, in Spalte 2 die Rücksortierungen dargestellt. Region R1 kennzeichnet in allen Sortierungen und Rücksortierungen, in denen der Fluoreszenzmarker Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> verwendet wurde, Region R2 in allen, in denen der Fluoreszenzmarker SAPE verwendet wurde, die Region der aussortierten Hefezellen. Die Angaben zu den Zellzahlen sind oberhalb des jeweiligen Dotplots, die relevanten Prozentangaben im Dotplot selbst angegeben.

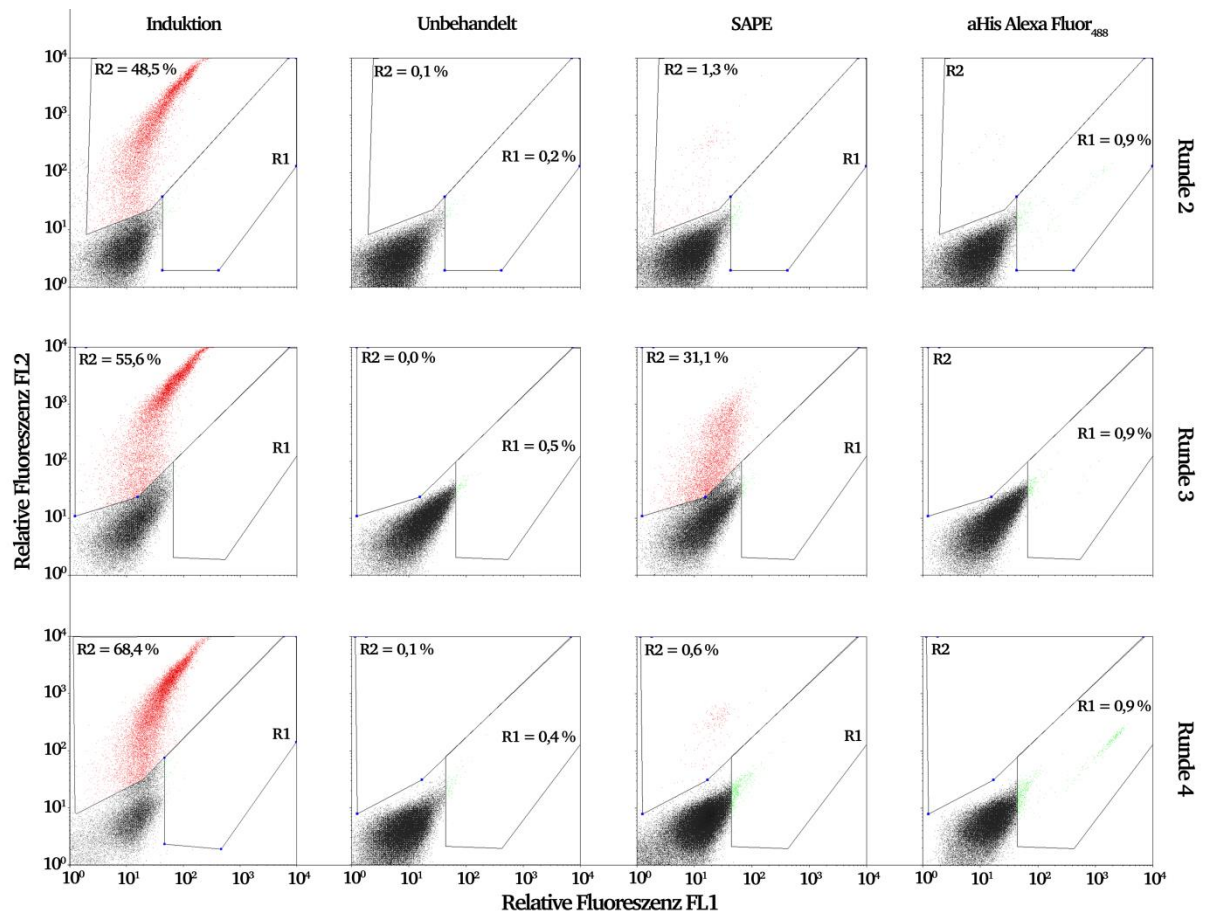


Abbildung 50: Daten der verschiedenen Analysen und Kontrollen der Durchmusterungsrunden 2-4 nach P-Cadherin bindenden Hefezellen jeweils dargestellt als Dotplot. **Induktion** (Spalte 1): Myc-Epitop-Analyse. **Unbehandelt** (Spalte 2): Nicht fluoreszenzmarkierte Hefezellen. **SAPE** (Spalte 3): Negativkontrolle zur Bestimmung der unerwünschten Anreicherung von Bindern gegen SAPE. **aHis AlexaFluor<sub>488</sub>** (Spalte 4): Negativkontrolle zur Bestimmung der unerwünschten Anreicherung von Bindern gegen Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat. Region R1 zeigt alle positiven Ereignisse im Fluoreszenz *scatter* FL1 (AlexaFluor<sub>488</sub>), R2 die positiven Ereignisse im Fluoreszenz *scatter* FL2 (PE). Relevante Prozentangaben sind in den jeweiligen Regionen angegeben. Es wurden je  $5 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

Im Anschluss an Runde 4 wurden für weitere Analysen fünf Einzelklone ausgehend von SD(-Trp)-Agar (2.9.2) kultiviert und die Genexpression induziert (3.2.2). Alle Einzelklone wurden zunächst auf ihre Bindung gegen P-Cadherin untersucht. Je  $10^7$  Hefezellen wurden mit P-Cadherin und Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat ( $10 \mu\text{g/ml}$  in PBS; Tabelle 4) markiert (3.8.1) und durchflusszytometrisch analysiert (3.8.2). Alle fünf Einzelklone zeigten ein Fluoreszenzsignal im Fluoreszenzkanal FL1 (FITC; Abbildung 51). Die Klone 2 und 4 wurden anschließend auf ihre Bindung gegen Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat getestet, um eine Bindung des Markierungsantikörpers auszuschließen. Keiner der beiden Klone zeigte ein entsprechendes Fluoreszenzsignal (Abbildung 52), wodurch die Bindung des P-Cadherins bestätigt wurde.



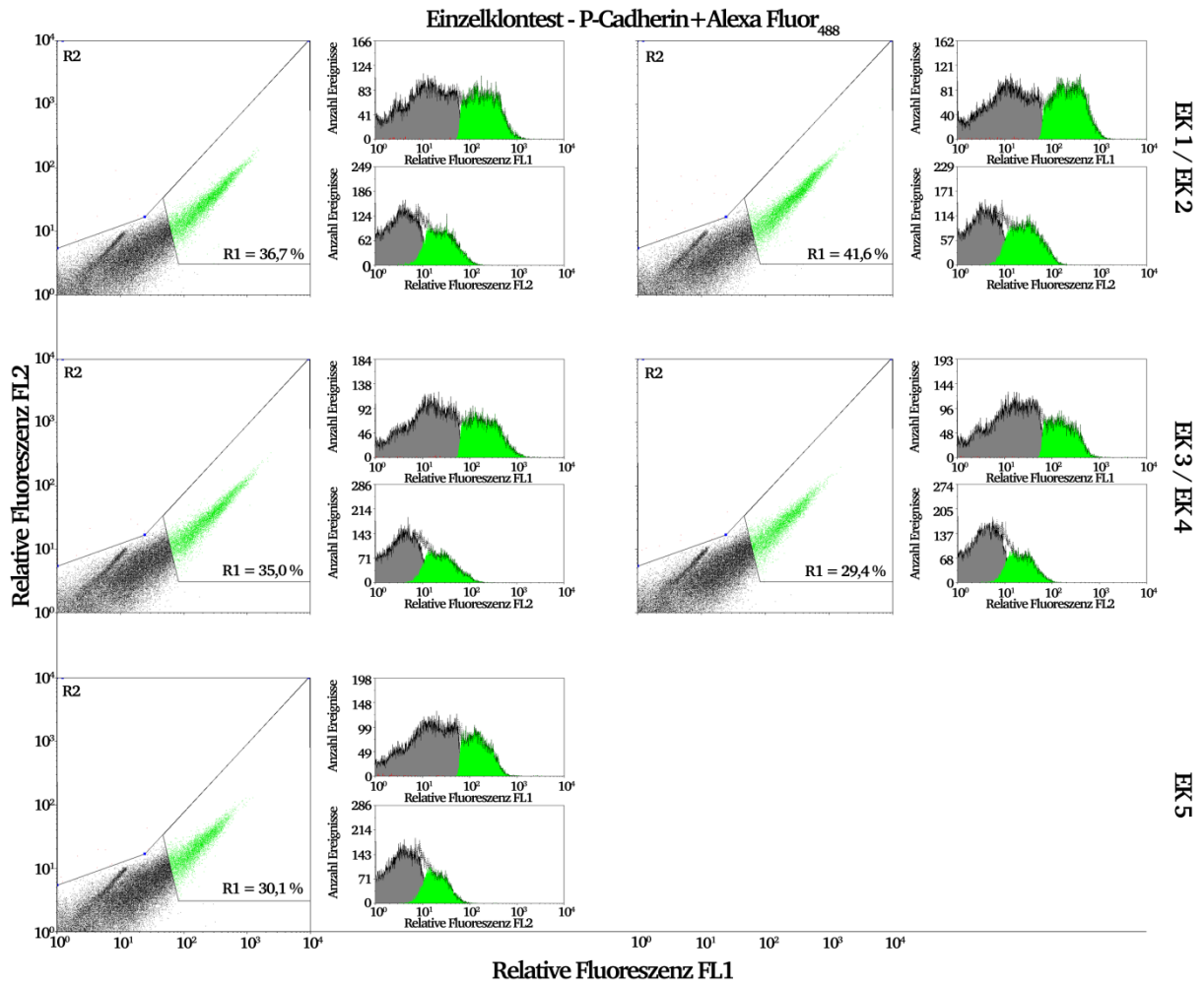


Abbildung 51. Daten der Einzelklon-Bindungstest der Klone 1-5 aus der Durchmusterung gegen P-Cadherin. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots sowie die dazugehörigen Histogramme der Fluoreszenzkanäle FL1 (FITC) und FL2 (PE) mit den Populationen aus den Regionen R1 und R2. Die gesamten Ereignisse sind dabei weiß hinterlegt, Ereignisse außerhalb der Regionen R1 und R2 grau und Ereignisse innerhalb der Regionen R1 und R2 grün bzw. rot hinterlegt. Die Region R1 beinhaltet alle durch P-Cadherin und Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat positiv markierten Hefezellen. Alle relevanten Prozentangaben sind im jeweiligen Dotplot angegeben. Es wurden je  $5 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

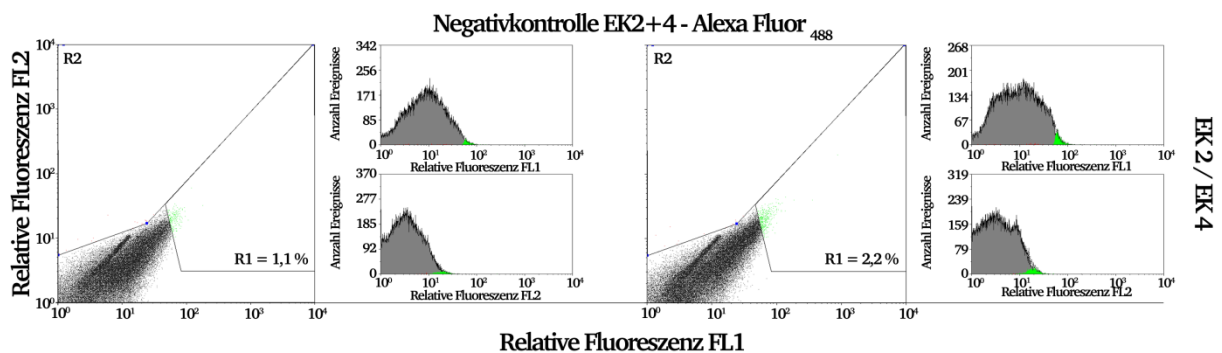


Abbildung 52. Daten der Negativkontrollen der Einzelklone 2 und 4 aus der Durchmusterung gegen P-Cadherin. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots sowie die dazugehörigen Histogramme der Fluoreszenzkanäle FL1 (FITC) und FL2 (PE). Die Region R1 beinhaltet alle durch Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat positiv markierten Hefezellen. Alle relevanten Prozentangaben sind im jeweiligen Dotplot angegeben. Es wurden je  $5 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

#### 4.1.9.9 Vertiefung der Analyse von Einzelklon 2 und 4

Um einen Einzelklon für weitere Analysen auszuwählen, wurde zunächst eine Sequenzanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Sequenz der Einzelklone 2-4 mittels Kolonie-PCR (3.4.4) und unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide pEX\_LVHH\_SfiI\_NheI\_up sowie pEX\_LVHH\_SfiI\_BamHI\_lo (Tabelle 3) amplifiziert und mithilfe des Restriktionsenzym *SfiI* in den Vektor pEXdsba (vergleiche 2.5.3) kloniert. Die Sequenzierung der VHH-DNA der drei Einzelklone wurde mit dem Oligonukleotid M13\_reverse (Tabelle 3) durchgeführt und diese mittels BioEdit (2.12) miteinander verglichen (Abbildung 53).

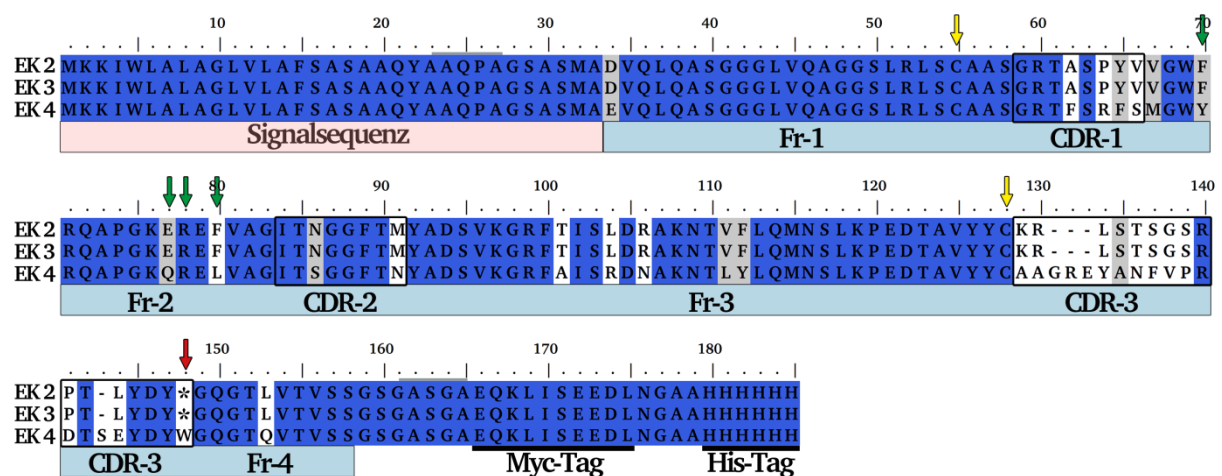


Abbildung 53: Sequenz-Daten der P-Cadherin-Einzelklone 2-4 durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid M13\_reverse (Tabelle 3). Konservierte Bereiche sind blau, Bereiche mit hoher Übereinstimmung grau unterlegt. Die Bedingungen für den *threshold* wurden dabei auf 70 % gesetzt. Die *framework*- sowie CDR-Bereiche sind unterhalb der Sequenzen beschriftet, die CDR-Bereiche zusätzlich mit einem schwarzen Kasten umrahmt. Intradomänen-Cysteine sind oberhalb der Sequenzen mit einem gelben Pfeil markiert. Grüne Pfeile markieren in VHH-Sequenzen typische substituierte Aminosäurereste (*hallmarks*)<sup>[44]</sup>. Der rote Pfeil zeigt die Position von Stopcodonen. Der Bereich der Signalsequenz ist durch einen roten Kasten, der der VHH-Sequenz durch einen graublauen Kasten unterhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Die grauen Balken oberhalb der Sequenzen zeigen die Position der *SfiI*-Restriktionsschnittstellen. Die Myc- und His-Epitop-Bereiche sind mit einem schwarzen Balken unterlegt und zusätzlich beschriftet.

Durch die Sequenzanalyse der Einzelklone 2, 3 und 4 (Abbildung 53) konnten eindeutig drei VHH-Sequenzen identifiziert werden, wobei es sich bei den Einzelklonen 2 und 3 um identische Sequenzen und somit um den gleichen Klon handelte. Sowohl vier VHH-typische Substitutionen (Positionen 70, 77, 78 und 79), als auch alle *framework*- und CDR-Bereiche konnten identifiziert werden. In den Sequenzen der Klone 2 und 3 am Ende der CDR3 ist ein Stopcodon an Position 148 lokalisiert, welches zu einer unvollständigen Translation des VHHs inklusive der Myc- und His-Epitope führt. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Analysen mit Einzelklon 4 weitergearbeitet, obwohl dieser bei der Bindungsanalyse mit P-Cadherin im Fluoreszenzkanal FL1 einen geringeren Anteil an positiv markierten Hefezellen (EK2=41,6 %; EK3=35,0 %; EK4=29,4 %) mit geringerem Mean Wert (EK2=291,5; EK3=264,1; EK4=204,2) aufwies (Abbildung 51).

Für weitere durchflusszytometrische Analysen wurde Einzelklon 4 im direkten Vergleich mit einem Kontroll-Hefestamm, welcher anstelle eines VHHs ein McoTI-Miniprotein auf seiner Oberfläche präsentierte, auf die Bindung verschiedener Antigene untersucht. Alle Antigene wurden in biotinylierter Form eingesetzt (3.5.7). Als Antigene wurden P-Cadherin, Erbitux (Merck KGaA, Darmstadt, Tabelle 4) und Gamunex-Präparat (Tabelle 4), das zu 98 % aus humanem Immunglobulin G besteht, eingesetzt. Letzteres diente vor allem dem Ausschluss einer unspezifischen Bindung.

Beide Hefeklone wurden hierfür kultiviert und die Genexpression induziert (3.2.2). Zuerst wurde die Zugänglichkeit der Myc-Epitope analysiert (3.8.1, 3.8.2, Abbildung 54). Anschließend wurden je  $10^7$  Hefezellen eingesetzt und mit 500 nM biotinyliertem P-Cadherin, Erbitux oder Gamunex inkubiert sowie mit SAPE fluoreszenzmarkiert. Je  $5 \times 10^4$  Ereignisse wurden im FACS analysiert (3.8.2, Abbildung 54). Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Hefen beider Proben zu etwa 80 % eine Oberflächenpräsentation zeigen (Abbildung 54, Induktion) und somit repräsentativ für die Antigenmarkierungen waren. Der McoTI präsenterende Kontrollstamm zeigte wie erwartet in keiner der Antigenmarkierungen ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 54). Einzelklon 4 dagegen ausschließlich ein der Myc-Markierung äquivalentes Signal bei der Markierung durch biotinyliertes P-Cadherin und SAPE (Abbildung 54, 80 % (FL2)).

Zur Ermittlung der Affinitätskonstante ( $K_D$ ) wurde zunächst die Titration auf der Oberfläche der Hefezellen genutzt (vergleiche 4.1.9.6). Hierzu wurde der Einzelklon 4 erneut kultiviert und die Genexpression induziert (3.2.2). Anschließend wurden je  $10^6$  Hefezellen für Markierungen (3.8.1) mit unterschiedlichen Konzentrationen an P-Cadherin (0 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1.000 nM und 2.000 nM) eingesetzt. Die Hefezellen wurden dabei für 45 min inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte anschließend mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugat (10  $\mu$ g/ml in PBS). Je  $5 \times 10^4$  Ereignisse wurden im Accuri Durchflusszytometer analysiert (3.8.4) und die Daten gemeinsam in Abbildung 55 zusammengetragen. Für die  $K_D$ -Berechnung wurde der Mean des Fluoreszenzkanals FL1 (FITC) erhoben. Die Affinitätskonstante wurde, erneut durch die Formel unter 4.1.9.6, auf einen  $K_D$ -Wert von 2,4  $\mu$ M berechnet.

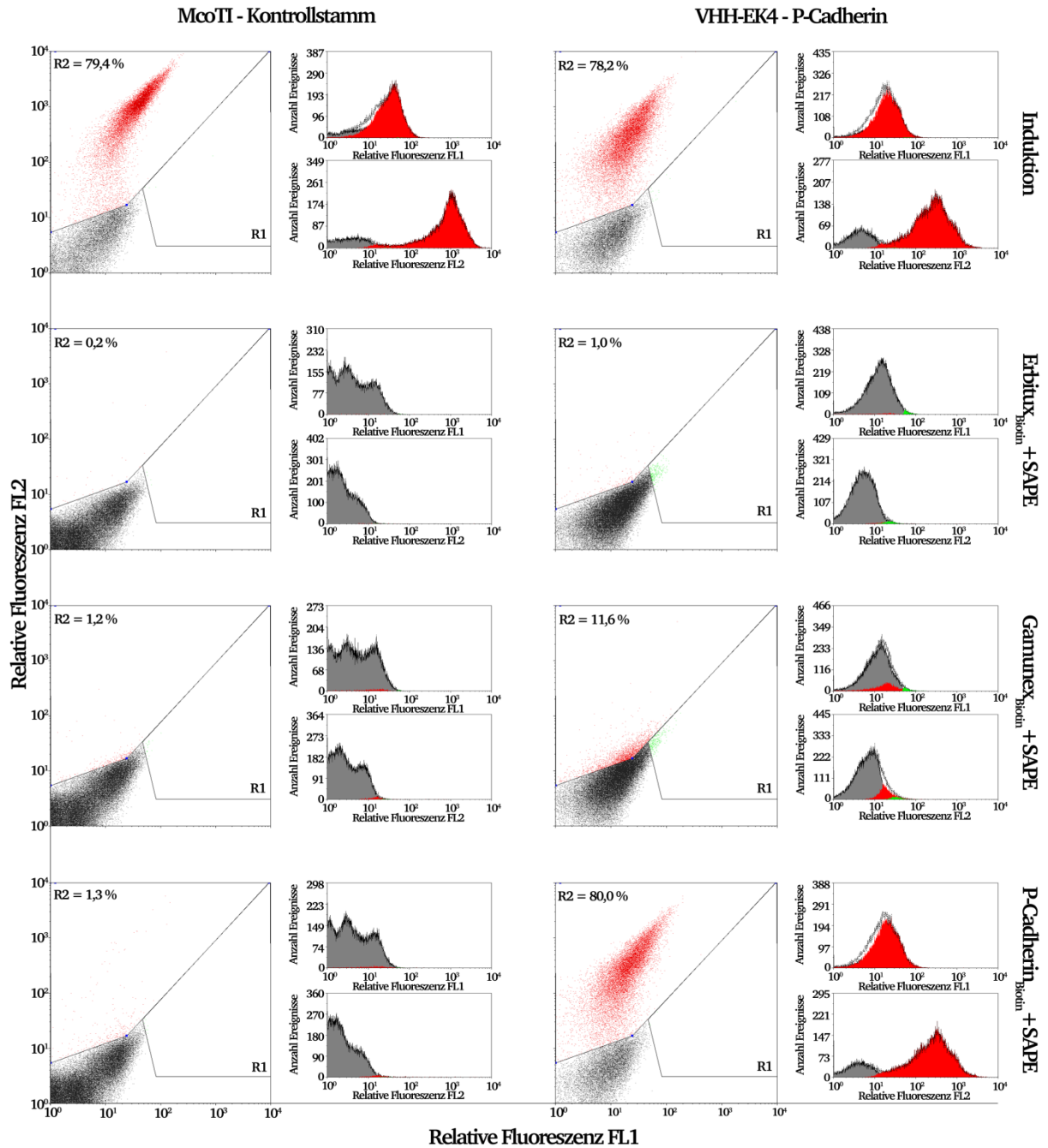


Abbildung 54: Daten der Bindungstest des Einzelklons 4 aus der Durchmusterung gegen P-Cadherin sowie eines McoTI präsentierenden Kontrollstamms. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots sowie die dazugehörigen Histogramme der Fluoreszenzkanäle FL1 (FITC) und FL2 (PE) mit den Populationen aus den Regionen R1 und R2. Die gesamten Ereignisse sind dabei weiß hinterlegt, Ereignisse außerhalb der Regionen R1 und R2 grau und Ereignisse innerhalb der Regionen R1 und R2 grün bzw. rot hinterlegt. Die Regionen R2 beinhalten in allen Messungen die positiv markierten Hefezellen. Alle relevanten Prozentangaben sind im jeweiligen Dotplot angegeben. Neben der Analyse des Myc-Epitops wurden folgende biotinylierten Antigene für die Markierungsregionen eingesetzt: Erbitux, Gamunex und P-Cadherin. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte jeweils mit SAPE. Es wurden je  $5 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

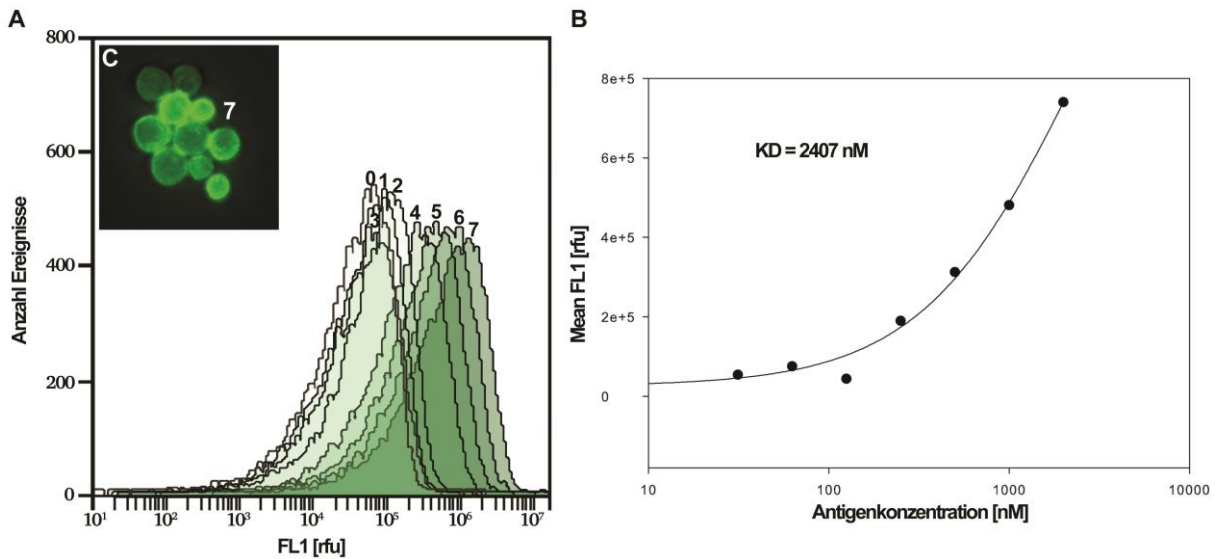


Abbildung 55: Daten der durchflusszytometrischen Analyse für die Titration auf Hefezellen zur Ermittlung der Affinitätskonstante des VHH-Antikörpers EK4 gegen P-Cadherin. 8 Aliquots wurden mit ansteigenden Konzentrationen an P-Cadherin (0=0 nM, 1=31,25 nM, 2=62,5 nM, 3=125 nM, 4=250 nM, 5=500 nM, 6=1.000 nM und 7=2.000 nM) inkubiert sowie mit 10  $\mu$ g/ml Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> fluoreszenzmarkiert und gemessen. Dargestellt sind die Einzelmessungen der FACS-Analyse zusammengefasst in einem Histogramm mit den Daten des Fluoreszenzkanals FL1 (FL1) (A) und die Mean-Werte der Einzelmessungen in Korrelation mit den eingesetzten Antigenkonzentrationen sowie die daraus berechnete Regressionsgerade (B). Die errechnete Affinitätskonstante ( $K_D$ ) von 2407 nM ist ebenfalls im Graph angegeben.

Zusätzlich sollte die  $K_D$  des Einzelklons 4 durch Messungen im *Octet RED System* (FortéBio) bestimmt werden. Hierfür musste der VHH-Antikörper zunächst löslich produziert werden. Dafür wurde das bereits vorliegende *E. coli*-Expressionssystem im Vektor pEX (vergleiche 2.5.3) gewählt. Der Vektor verfügt über einen durch IPTG induzierbaren Lac-Promotor sowie eine Dsba-Signalsequenz, welche die Translokation ins Periplasma vermittelt. Durch die Integration des VHH-Gens mit den beiden *Sfi*-Schnittstellen wird das VHH-Gen C-terminal mit einem Myc- sowie His-Epitop fusioniert. Wie in Abbildung 53 gezeigt, konnte die VHH-Sequenz des Einzelklons 4 zuvor bereits erfolgreich in den Vektor pEX kloniert werden (4.1.9.9). *E. coli* JM109 wurde mit der Plasmid-DNA pEXdsbaEK4VHH<sub>P-Cadherin</sub> transformiert und für die Produktion zunächst eine 50 ml Vorkultur in dYT-Medium angelegt. Anschließend wurde damit eine 1 l Kultur inokuliert und die VHH-Produktion wie unter 3.1.5 beschrieben durchgeführt. Die anschließend geernteten Zellen wurden aufgeschlossen (3.5.3) und mittels IMAC (3.5.4) die VHH-Antikörper gereinigt. Der Erfolg von Expression und IMAC wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese (3.5.2) überprüft (Abbildung 56). In der erwarteten Höhe von etwa 16 kDa konnte eine Bande, die dem VHH-Antikörper entspricht, in allen Fraktionen beobachtet werden. Die Fraktion mit 500 mM Imidazol wurde für die anschließenden Messungen verwendet, da hier das geringste Maß an Verunreinigung vorlag. Auf eine anschließende Dialyse wurde hier verzichtet, da in vorangegangenen Versuchen große Mengen an Proteinen ausfielen (Daten nicht gezeigt). Die photometrische Konzentrations-Bestimmung ergab 60  $\mu$ g/ml an VHH-Antikörper und somit eine Ausbeute von 0,6 mg/l.



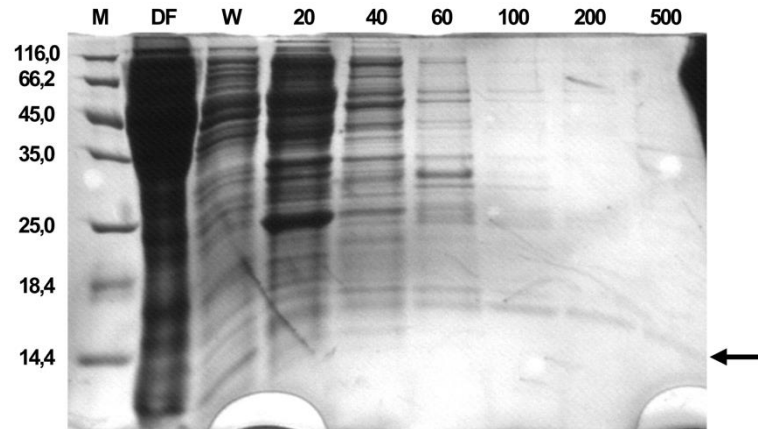


Abbildung 56: SDS-Gelelektrophorese nach IMAC zur Reinigung des VHH-Antikörpers EK4 gegen P-Cadherin. Es wurden etwa 12  $\mu$ l Probe mit 5  $\mu$ l HOECHST-Puffer vermengt, aufgeköcht und anschließend aufgetragen. M=Unstained Protein Marker (Fa. Fermentas), DF=Durchfluss, W=Wasch-Schritt, 20-500=Elutionslösungen mit entsprechender Imidazol-Konzentration. Aufgetragen wurden jeweils Der schwarze Pfeil markiert die VHH-Banden in einer Höhe von etwa 16 kDa.

Da das Antigen P-Cadherin nur in einer limitierenden Menge zur Verfügung stand, wurden die VHH-Antikörper biotinyliert (3.5.7) und im *Octet RED System* an Streptavidin-Spitzen immobilisiert (3.5.9). Für die Charakterisierung wurden zwei Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment sollte die Antigen-Spezifität der VHHs gegen P-Cadherin ermittelt werden. Nach der Beladung der Sensoren mit VHH-Antikörpern, wurde die Bindung von P-Cadherin bzw. der Kontrollproteine in Form der Assoziation und Dissoziation gemessen. Die biotinylierten VHH-Antikörper wurden in allen Messungen in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml ( $\sim 3 \mu$ M) in PBS eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden CD267 (B7-H3), Gamunex und Erbitux verwendet (Tabelle 4). Die Antigene wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: P-Cadherin=113 nM und 55 nM (Abbildung 57, 1 bzw. 2); CD276=100 nM (Abbildung 57, 3); Gamunex=50 nM und 5 nM (Abbildung 57, 4 bzw. 5); Erbitux=50 nM, 25 nM und 5 nM (Abbildung 57, 6-8). Die Sensoren wurden vor der Messung etwa 30 min in PBS äquilibriert. Die Messung erfolgte bei RT. Die Einzelschritte mit den jeweiligen Zeiten sind in Abbildung 57 gezeigt.

An allen Sensoren zeigt sich ein Schichtdickenzuwachs bei der Beladung mit VHH-Antikörpern (Abbildung 57 A - Beladung). Beim Assoziationsschritt wurde nur in den Kavitäten mit P-Cadherin eine Zunahme der Schichtdicke gemessen. In den Kavitäten mit den Kontroll-Proteinen zeigten sich keine wesentliche Veränderungen (Abbildung 57 A bzw. C - Assoziation). Bei der Dissoziation zeigte sich eine stabile Bindung des P-Cadherins an die VHH-Antikörper über den gemessenen Zeitraum von 13 min (Abbildung 57 A bzw. C - Dissoziation).

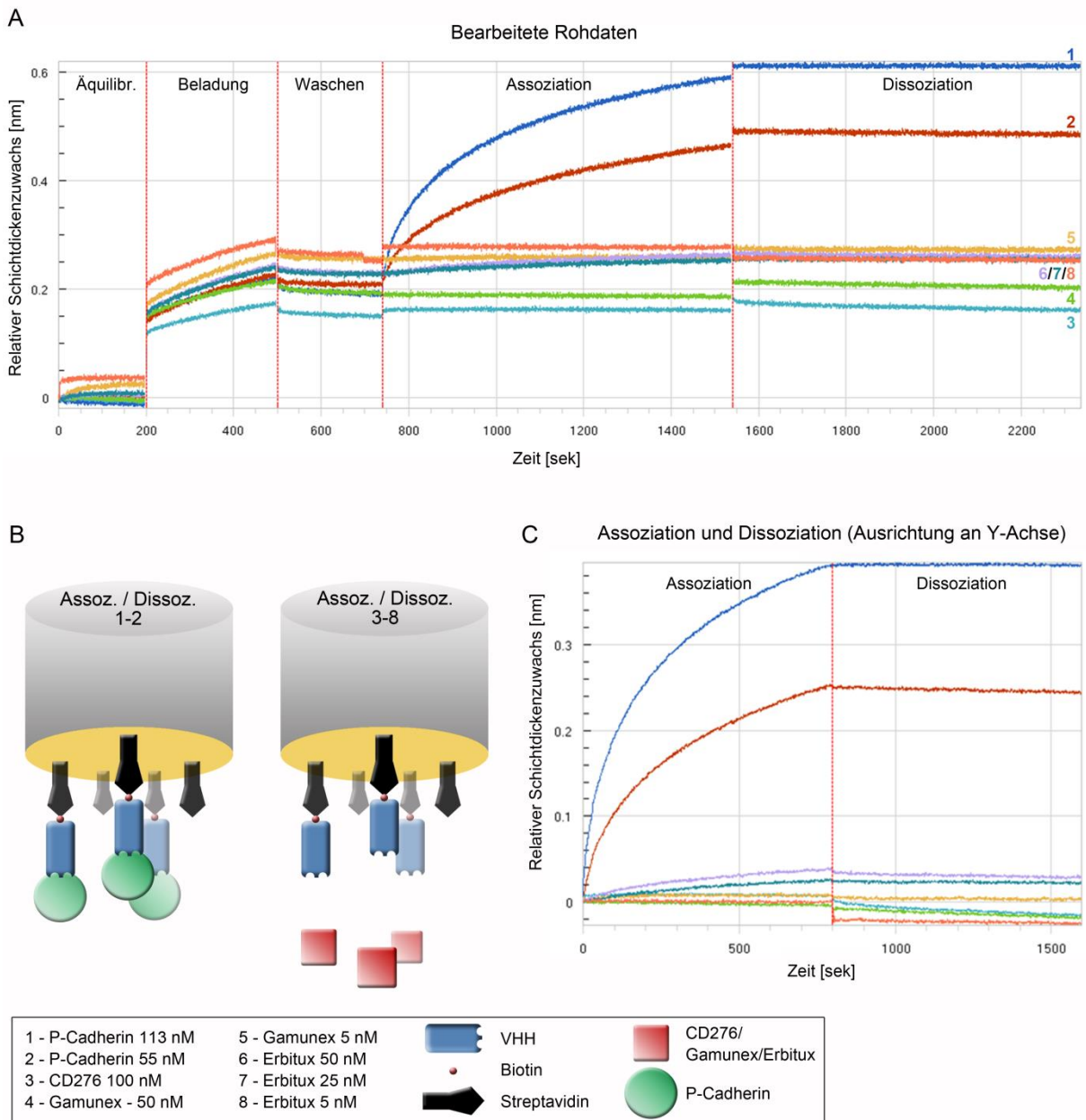


Abbildung 57: Messung der Antigenspezifität des VHH-Antikörpers EK4 gegen P-Cadherin mittels *Bio-Layer Interferometry*. Neben dem spezifischen Antigen P-Cadherin (1 und 2; grüner Kreis), wurden CD276, Gamunex und Erbitux (3-8; rotes Rechteck) als Kontrollen eingesetzt. In allen Schritten wurde PBS als Puffer verwendet. Die verwendeten Streptavidin-Sensoren wurden mit biotinylierten VHH-Antikörpern beladen (A - Beladung). Im Assoziations-schritt wurde die Bindung der Antigene gemessen (A - Assoziation; B; C - Assoziation). Für die Dissoziation wurden die Sensoren wieder in PBS überführt (A - Dissoziation; B; C - Dissoziation).

Das zweite Experiment diente der Einordnung der  $K_D$  des P-Cadherin bindenden VHH-Antikörpers (Einzelklon 4). Hierbei wurde P-Cadherin in vier verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und wie in der vorherigen Messung die Sensoren zuvor mit biotinylierten VHH-Antikörpern (50  $\mu\text{g/ml}$ ) beladen. P-Cadherin wurde in den Konzentrationen 55 nM, 27 nM, 13 nM, bzw. 6 nM verwendet. Als Negativkontrolle zur Bestimmung der  $K_D$  wurde als Antigen Erbitux (13 nM) eingesetzt. Die gemessenen Daten der Negativkontrolle wurden von den

Rohdaten der Messungen mit P-Cadherin subtrahiert. Die Sensoren wurden vor der Messung wieder etwa 30 min in PBS äquilibriert. Die Einzelschritte mit den jeweiligen Zeiten sind in Abbildung 58 und Tabelle 17 gezeigt.

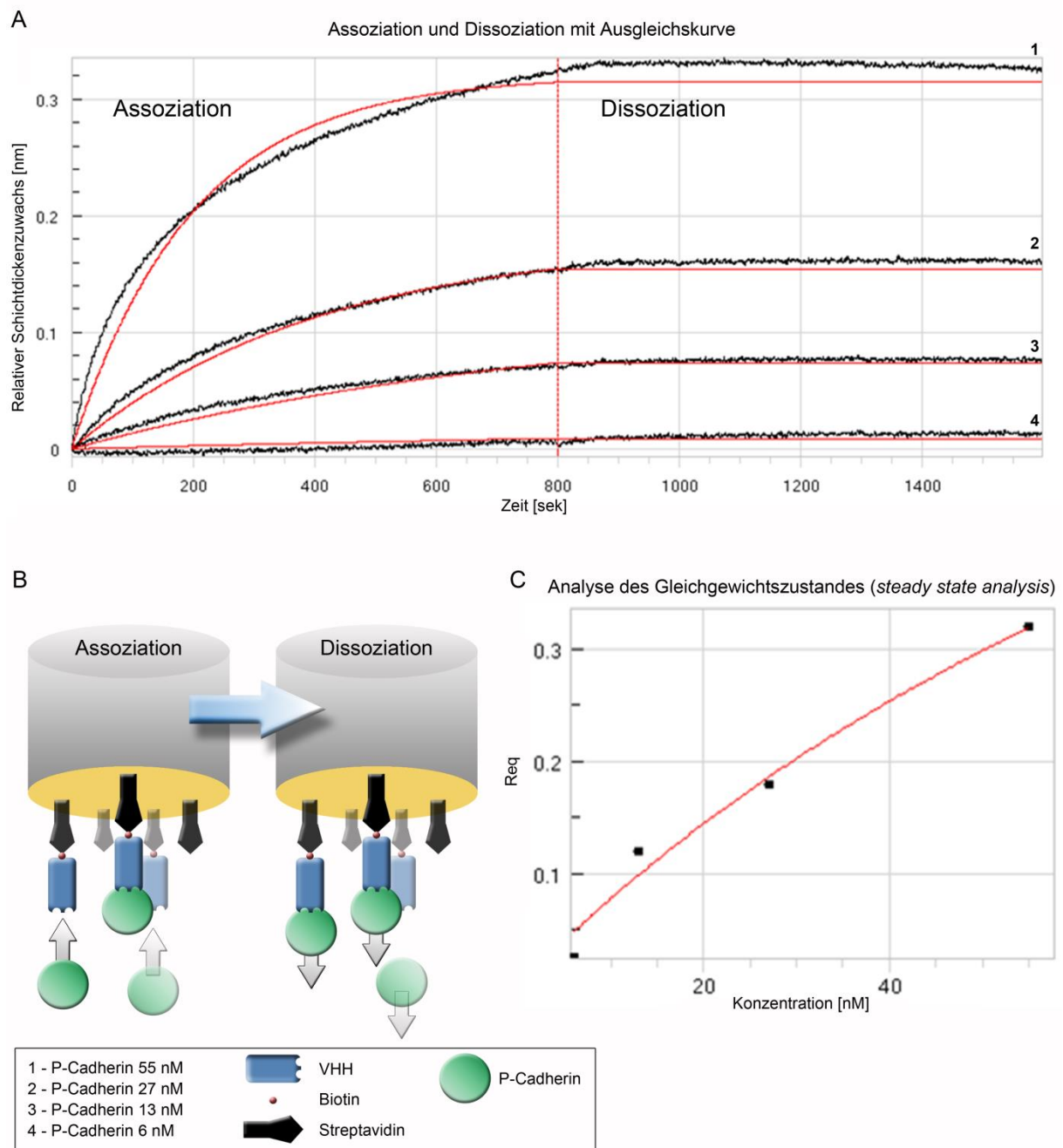


Abbildung 58: Messung der Affinität des VHH-Antikörpers EK4 gegenüber P-Cadherin mittels *Bio-Layer Interferometry*. Das Antigen P-Cadherin (**B**, grüner Kreis) wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (**A** und **B**, 1-4). In allen Schritten wurde PBS als Puffer verwendet. Die verwendeten Streptavidin-Sensoren wurden mit biotinylierten VHH-Antikörpern beladen. Im Assoziationsschritt wurde die Bindung des P-Cadherin gemessen (**A** und **B** - Assoziation). Für die Dissoziation wurden die Sensoren wieder in PBS überführt (**A** und **B** - Dissoziation). In **C** ist die *steady state analysis* dargestellt.



Tabelle 17: Verwendete Materialien, Parameter und Antigenkonzentrationen für die Bestimmung der Affinitätskonstante des P-Cadherin VHHs (EK4) im *Octet RED System* (FortéBIO)

Antikörper	Antigen	Sensor	C <sub>Antigen</sub> [nM]	K <sub>D</sub> [M] <sup>a</sup>	K <sub>D</sub> [M] <sup>b</sup>
VHH-EK4 <sub>Biotin</sub>	P-Cadherin	Streptavidin	6/13/27/55	<10 <sup>-12</sup>	1,2x10 <sup>-7</sup>

Die Messungen zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung des P-Cadherin an die immobilisierten VHHs (Abbildung 58 A). Wie im ersten Experiment war auch hier die Bindung über die Zeit sehr stabil. Die gemessene  $k_d$  war mit  $<1 \times 10^{-7}$  (1/s) sehr niedrig. Die dadurch errechnete  $K_D$  lag deshalb im subnanomolaren Bereich (Tabelle 17,  $K_D^a$ ). Aus diesem Grunde wurde zusätzlich das *steady state* Modell zur Ermittlung der Affinitätskonstante betrachtet (Abbildung 58 C), obgleich die Messkurven bei der Assoziation nicht ganz bis in die stationäre Phase gelangten (Abbildung 58 A). Die hierbei errechnete  $K_D$  lag mit 120 nM (Tabelle 17,  $K_D^b$ ) eine Zehnerpotenz unter der durch Titration bestimmten Affinitätskonstante (vergleiche Abbildung 55) und somit in einem angemessenen Toleranzbereich.

#### 4.1.9.10 Diskussion der Ergebnisse

Das letzte beschriebene Beispiel der Durchmusterungen der naiven VHH-Bibliothek in Hefen befasste sich mit der Isolierung von Bindern gegen das humane P-Cadherin (siehe 1.7). Im Vorfeld wurde bereits eine Durchmusterung gegen P-Cadherin erfolglos versucht (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnten nur Binder gegen den eingesetzten Fluoreszenzmarker Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (Tabelle 4) angereichert werden. Parallel zu dieser Durchmusterung wurde ebenfalls eine Sortierung der Bibliothek zur Isolierung von Bindern gegen CD276 (B7-H3) durchgeführt, die zum gleichen Ergebnis führte (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte in diesem zweiten Versuch abwechselnd biotinyliertes P-Cadherin sowie SAPE und Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> eingesetzt werden, um eine ungewollte Anreicherung an Bindern gegen SAPE bzw. Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> nicht zu begünstigen.

Durch die abwechselnde Verwendung von Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> und SAPE zur Fluoreszenzmarkierung des P-Cadherins konnte gezeigt werden, dass entsprechende Binder zwar weiterhin in den Negativkontrollen vor den einzelnen Runden detektiert wurden (Abbildung 50), diese jedoch wieder abgereichert und auf ein vernachlässigbares Maß reduziert werden konnten. Die Anreicherung an Bindern gegen P-Cadherin war in dieser Durchmusterung nicht so effektiv wie die Anreicherungen in den beiden anderen Projekten (vergleiche 4.1.9.1 und 4.1.9.4), reichte jedoch aus, um in der anschließenden Analyse erfolgreich Einzelklone identifizieren zu können (Abbildung 51 und Abbildung 52).

Die Sequenzanalyse der Einzelklone zwei, drei und vier, nach Klonierung der VHH-Sequenz in den *E. coli* Vektor pEX, zeigte, dass die Klone zwei und drei identisch waren und über ein

Stopcodon am Ende der CDR3 aufwiesen (Abbildung 53). Da Klon vier eine intakte Sequenz inklusive Myc- und His-Tag verfügte, wurde dieser trotz seiner etwas geringeren Signalstärke (Abbildung 51) im Durchflusszytometer für weitere Untersuchungen gewählt. In beiden Formaten -immobilisiert auf Hefen sowie löslich exprimiert durch *E. coli*- konnten die spezifischen Bindeeigenschaften des VHH-Moleküls gezeigt werden. Abbildung 54 und Abbildung 57 zeigen die Bindestudien mit P-Cadherin und den Kontrollen mit Erbitux, Gamunex, SAPE und CD276.

Die Titration auf Hefezellen wurde benutzt, um eine Affinitätskonstante zu ermitteln (Abbildung 55), welche auf etwa  $2,4 \mu\text{M}$  berechnet wurde. Zusätzlich zur Titration wurde der VHH des Einzelklons vier in *E. coli* exprimiert und für eine  $K_D$ -Bestimmung im *Octet RED System* (fortéBIO; 3.5.9) eingesetzt (Abbildung 58). Die hierbei ermittelte  $K_D$  betrug etwa  $10^{-12}$  M. Grund für diesen sehr niedrigen Wert ist die Dissoziationsrate ( $k_d$ ), welche im gemessenen Zeitraum (800 sek) kaum existent war (Abbildung 58). Die Dissoziationsrate wurde auf  $<10^{-7}/\text{s}$  ermittelt. Für Messungen mit Dissoziationsraten dieser Größenordnung bei entsprechend relativ kurzen Dissoziationszeiten können pauschale Grenzwerte im Bereich zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  angenommen werden <sup>[197], [209], [210]</sup>. Nimmt man einen pauschalen Wert von  $k_d=10^{-4}/\text{s}$  an, so beträgt die berechnete  $K_D$   $1,09 \times 10^{-9}$  M ( $k_a=9,18 \times 10^4/\text{Ms}$ ). Dieser Wert entspricht lediglich einer Annäherung und entspricht noch immer nicht den Daten aus der Titration (Abbildung 55). Eine letzte Möglichkeit die  $K_D$  anhand der Messung im *Octet RED System* zu bestimmen, ist die *steady state* Analyse. Obwohl in diesem Fall bei der Assoziation kein Gleichgewicht erreicht wurde, wurde dieser Wert zur Analyse betrachtet (Abbildung 58 C). Die Affinitätskonstante der *steady state* Analyse betrug  $1,2 \times 10^{-7}$  M. Dieser Wert liegt etwa eine Zehnerpotenz unter dem der Titrationsbestimmung. Für eine exakte Bestimmung der Affinitätskonstante wären eine Optimierung der VHH-Expression mit anschließender, vollständiger Reinigung des Moleküls sowie eine Mehrfachbestimmung der Messwerte im *Octet RED System* mit einer größeren Konzentrationsspanne nötig. Außerdem sollte zum Vergleich eine Beladung der Sensoren mit P-Cadherin mit anschließender Bindungsanalyse des VHHs gewählt werden. Zur besseren Ermittlung der Dissoziationsrate ( $k_d$ ) wäre dabei ein ausreichender Messzeitraum für die Dissoziation nötig. Abschließend kann gesagt werden, dass erfolgreich Binder gegen P-Cadherin aus der naiven VHH-Bibliothek in Hefen angereichert werden konnten sowie ein VHH-Antikörper isoliert wurde, dessen Bindeeigenschaften charakterisiert und eine Affinitätskonstante im Bereich von etwa  $0,1\text{-}2 \mu\text{M}$  ermittelt wurde.

---

#### 4.1.10 Zusammenfassung

---

Die beschriebenen Analysen und vorgestellten Projekte zeigen, dass sich die vorliegende naive VHH-Bibliothek in Hefen dazu eignet, Binder gegen die verschiedensten Antigene isolieren zu können (vergleiche 4.1.9.1, 4.1.9.4 und 4.1.9.8). Die dabei unter Umständen auftretenden Anreicherungen von VHH präsentierenden Hefezellen mit Affinitäten gegenüber den Fluoreszenzmarkern können durch geeignete Durchmusterungsstrategien vermieden werden (ver-

gleiche 4.1.9.4 und 4.1.9.8). Die bisher ermittelten Affinitätskonstanten im Bereich 0,1-5  $\mu\text{M}$  sind hoch, liegen jedoch im erwarteten Bereich, da es sich hierbei nicht um eine durch Immunisierung optimierte Bibliothek handelt. Die isolierten VHH-Antikörper könnten anschließend beispielsweise mit Methoden der *in vitro* Optimierung, wie *error prone PCR*, *shuffling* oder codonbasierte Randomisierung, in ihren Eigenschaften verbessert werden <sup>[19]</sup>. Diese Plattform stellt demnach eine kostengünstige und vielseitig einsetzbare Ressource zur Isolierung von VHH-Antikörpern gegen potentiell jedes eingesetzte Antigen dar.

## 4.2 Erstellung und Durchmusterung einer durch Immunisierung affinitätsgereiften VHH-Bibliothek aus *Lama glama*

Als Alternative zum naiven Repertoire sollte eine durch Immunisierung affinitätsgereifte VHH-Antikörper-Bibliothek in Hefen erstellt werden. Im Gegensatz zu einem naiven Repertoire, das i. d. R. ein großes Potential an Binder gegen verschiedenste Antigene beinhaltet, ist die Diversität an Bindern in Bezug auf die Anzahl der Antigene in einer affinitätsgereiften Bibliothek eingeschränkt <sup>[211]</sup>. Jedoch bietet diese Strategie in den meisten Fällen das Potential, stabilere und affinere Binder gegen die bei der Immunisierung eingesetzten Antigene zu isolieren (vergleiche 1.4). Für die Immunisierung wurde eine Strategie mit mehreren Antigenen gewählt. So sollte durch die Immunisierung eines einzelnen Tiers der größtmögliche Output erzeugt werden.

Das Design zur Klonierung und Erstellung der Bibliothek basiert auf der bereits etablierten Plattform der naiven Hefe-Bibliothek in den Abschnitten 4.1.6-4.1.10. Auch hier sollte die amplifizierte VHH-DNA in den Vektor pCT (2.5.2) integriert und als Aga2-Fusion auf der Oberfläche der Hefe *S. cerevisiae* über die Bindung an Aga1 präsentiert werden (vergleiche Abbildung 29 und Abbildung 36). In den folgenden Abschnitten werden die Immunisierung des Lamas (4.2.1) mit Analyse der Seren (4.2.1.1), die Klonierung des VHH-Repertoires im Vektor pCT (4.2.1.2) und die Transformation der Hefen (4.2.2) beschrieben.

### 4.2.1 Erstellung einer affinitätsgereiften VHH-Antikörper-Bibliothek in Hefen

Für die Immunisierung wurde ein einzelnes Lama (*Lama glama*; Name: „Masko“) eingesetzt, welches einen Antigencocktail, bestehend aus sieben verschiedenen Antigenen, in vier Einzeldosen injiziert bekam. Die Immunisierung wurde von der Firma Preclinics (Potsdam, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 18: Aufstellung der Immunisierungsstrategie mit Angaben zu Zeitplan und Behandlungen.

Tag	Behandlung
0	Präimmunserum / 1. Injektion
21	2. Injektion
35	3. Injektion
39	Serumprobe
49	4. Injektion
54	Blutentnahme

Die Gesamtdauer der Immunisierung betrug 54 Tage, wobei an Tag 0 und 39 jeweils eine Serumprobe zur Kontrolle der Immunantwort entnommen wurde (vergleiche Tabelle 18). Die Injektionen erfolgten an den Tagen 0, 21, 35 und 49. Die Entnahme der finalen Blutprobe wurde an Tag 54 durchgeführt. Die eingesetzten Antigene Aktin (*S. cerevisiae*), ein (NH<sub>2</sub>)Diketon, huEGFR, mEGFR, EphA2, HtrA1 und Saglin (vergleiche 1.7; Tabelle 4) wurden in jeder Injektion zu je 200 µg eingesetzt. Dabei wurde für die erste Injektion 50 % KFA (komplettes Freund's Adjuvans) und 50 % IFA (inkomplettes Freund's Adjuvans) sowie für die Injektionen 2-4 100 % IFA verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Antigen-Cocktails für die Immunisierung des Lamas „Masko“. Jede Injektion wurde identisch zusammengesetzt. Lediglich für die erste Injektion wurde anstatt 100 % IFA, 50 % KFA und 50 % IFA verwendet.

Antigen	Gesamtmasse pro Applikation	Details/Herkunftsorganismus
Aktin	je 200 µg	Zytoskelett-Protein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Diketon		Synthetisiertes (NH <sub>2</sub> )Diketon
EphA2		EPH Rezeptor A2 /Ephrin Typ-A Rezeptor II aus der Ephrin Rezeptor Unterfamilie
HtrA1		Humanes HtrA1 ( <i>high temperature requirement A1 serine protease</i> )
huEGFR		externe Domäne des humanen EGF-Rezeptors
mEGFR		externe Domäne des murinen EGF-Rezeptors
Saglin		Protein aus den Speicheldrüsen der Anopheles Mücke

#### 4.2.1.1 Immunchemische Analyse des Prä- und Postserums

Nach Erhalt der beiden Serumproben wurden diese zunächst immunchemisch untersucht (3.5.8). Durch Vergleich der Bindeeigenschaften der in Prä- und Postserum enthaltenden Antikörper, sollte der Erfolg der Immunisierung analysiert werden. Als Reporter-Antigen wurde im ersten Experiment Saglin (Abbildung 59 A) und im zweiten Experiment huEGFR, mEGFR sowie EphA2 eingesetzt (Abbildung 59 B). Als Negativkontrollen wurden bovines Serumalbumin (BSA) und Glukoseoxidase (GOX) verwendet. Die Detektion der Antikörper in den ELISA-Experimenten wurde durch ein Konjugat aus Protein A (Bindung an die CH1/hinge-Region von Antikörpern) und alkalischer Phosphatase erzielt. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde Nitrophenylphosphat (Tabelle 5) eingesetzt.

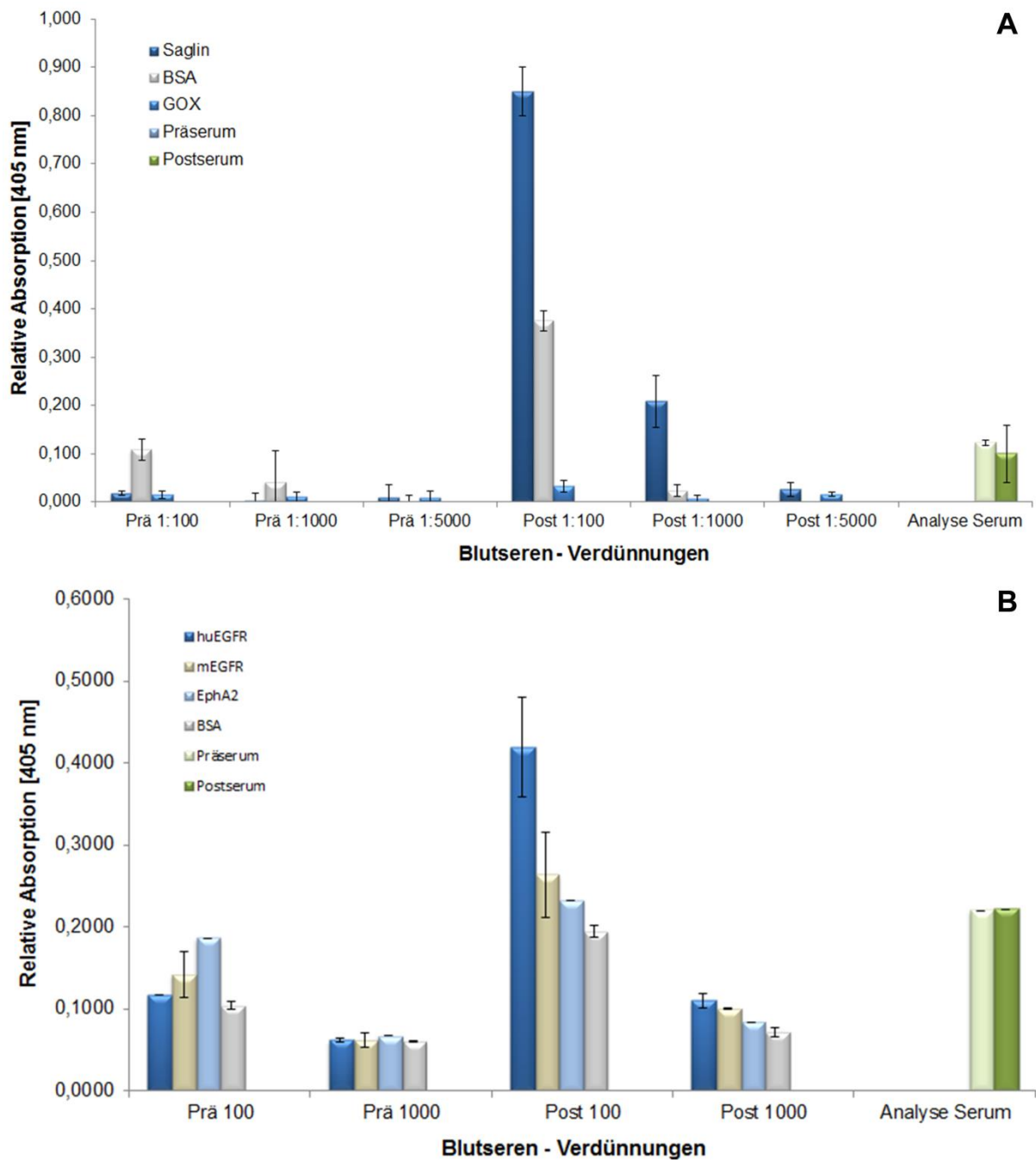


Abbildung 59: Immunchemische Analyse des Prä- und Postserums des Lamas „Masko“ vor und während der Immunisierung für den Nachweis einer antigenspezifischen Immunantwort. Für den Nachweis wurde Saglin (200 µg/ml, A) bzw. huEGFR, mEGFR und EphA2 (10 µg/ml, B) als Antigen, für die Kontrolle BSA (1 mg/ml, A und B) sowie eine Glukoseoxidase (A, je 1 mg/ml) auf Maxisorb-Platten aufgebracht und die Seren anschließend in den Verdünnungen 1:100 (A+B), 1:1.000 (A+B) und 1:5.000 (A) zugegeben. Zusätzlich wurden die Seren direkt (1:2 Verdünnung) auf die Maxisorb-Platten aufgebracht (Präserum, Postserum; Analyse Serum). Der Nachweis der Antikörper und die anschließende Detektion erfolgte durch Protein A-Alkalische Phosphatase Konjugat (0,2 µg/ml) und Nitrophenylphosphat (1 mg/ml). Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen (A) bzw. Zweifachbestimmungen (B) und der Mittelwert wurde bestimmt. Der Nullwert (nur PBS) wurde von allen Mittelwerten subtrahiert. Die Standardabweichungen sind durch schwarze Balken angegeben.

Zusätzlich zur Beschichtung der Maxisorb-Platten mit Antigen, wurden Kavitäten mit den Seren beschichtet, um die generelle Nachweisbarkeit der Antikörper im Überstand zu kontrollieren (Abbildung 59 A und B, Analyse Serum).

Das Ergebnis der Analyse in Abbildung 59 zeigt, dass bei allen eingesetzten Antigenen ein gesteigertes Fluoreszenzsignal im Vergleich von Prä- und Postserum beobachtet werden konnte. Für Saglin und huEGFR war der Anstieg des Signals von Prä- zu Postserum besonders stark (Abbildung 59 A und B). Antikörper im Serum konnten in beiden Proben detektiert werden (Abbildung 59 A und B, Analyse Serum).

---

#### 4.2.1.2 Amplifikation und Modifikation der VHH-DNA sowie des Vektors pCT

---

Die Blutproben wurden in zwei verschiedenen Formen verarbeitet und geliefert. Ein Teil wurde direkt nach Entnahme in 10 *PAXgene<sup>®</sup>Blood RNA tubes* (Preanalytix, Heidelberg; 3.6.5) transferiert und die RNA dadurch dauerhaft stabilisiert. Jedes Röhrchen fasst ein Volumen von 2,5 ml. Der andere Teil wurde mit Gerinnungshemmer Heparin sowie Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Die RNA der heparinisierten Probe wurde mittels *TRI Reagent BD<sup>®</sup>* (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA) extrahiert (3.6.5) und die RNA dauerhaft bei -20 °C in Isopropanol gelagert. Die RNA der Blutproben in den *PAXgene<sup>®</sup>Blood RNA tubes* wurde mit dem *PAXgene<sup>®</sup> Blood miRNA Kit* extrahiert (3.6.5) und direkt für die Reverse Transkription in cDNA eingesetzt (3.6.6). Für jede Reaktion wurden etwa 0,1-1 µg RNA eingesetzt sowie Oligo(dT)<sub>20</sub>- oder *Random Hexamer Primer* (Tabelle 3) verwendet. Direkt nach der cDNA-Synthese wurde die RNA mittels RNaseH degradiert.

Das Konzept zur Herstellung der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen basierte auf den gewonnen Erkenntnissen der erstellten naiven VHH-Bibliotheken (4.1.1, 4.1.3 und 4.1.6). Wieder sollte die translatierte cDNA als Matrize in einer dreistufigen PCR eingesetzt werden (vergleiche Abbildung 28). Nach einer Extraktion der VHH-DNA aus dem Agarosegel zur Abtrennung der VH-DNA, wurden in den PCR#2 und PCR#3 Schnittstellen und homologe Sequenzbereiche angefügt. Für die PCR#1 wurden 96 Einzelreaktionen durchgeführt. Je Reaktion (3.4.3) wurden 3 µl cDNA-Gemisch und die Oligonukleotide LVHH-PCR1\_up und LVHH-PCR1\_lo (Tabelle 3) eingesetzt. Der Erfolg der PCR wurde anschließend gelelektrophoretisch (3.3.5) durch Auftrennung acht zufällig ausgewählter Amplifikate analysiert (Abbildung 60 A). Die gesamte DNA aller 96 Einzelansätze wurde anschließend vereint und nach gelelektrophoretischer Auftrennung die VHH-DNA (~600 bp) aus dem Gel extrahiert (3.3.6), um dabei amplifizierte VH-DNA (~850 bp) abzutrennen.



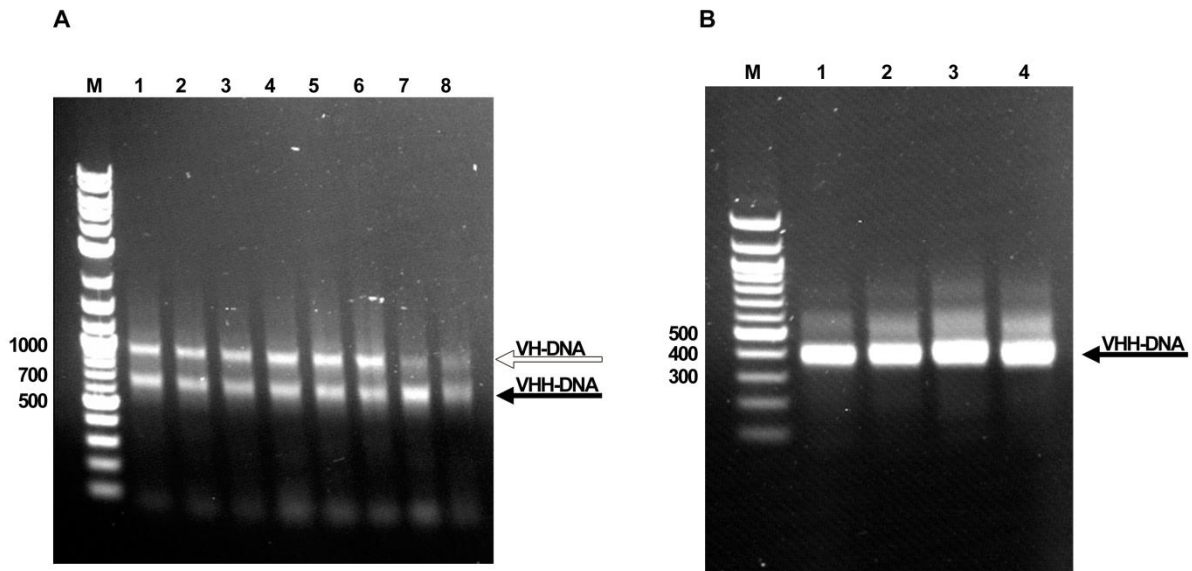


Abbildung 60: Analyse der Agarosegelelektrophorese (1% [w/v]) der PCR#1 und #2 zur Amplifizierung der VHH-DNA für die Herstellung der affinitätsgereiften Bibliothek in Hefen. Es wurden acht zufällig ausgewählte PCR-Ansätze (1-8) der PCR#1 mit den Oligonukleotiden LVHH-PCR1\_up/lo analysiert. Das VH-Amplifikat (~850 bp) ist mit einem weißen Pfeil, das VHH-Amplifikat (~600 bp) mit einem schwarzen Pfeil markiert (A). Für die PCR#2 mit den Oligonukleotiden LVHH-pCT-PCR2\_up/lo wurden vier zufällig ausgewählte PCR-Reaktionen elektrophoretisch aufgetrennt (1-4). Die VHH-DNA (~400 bp) ist ebenfalls mit einem schwarzen Pfeil markiert (B). **M(A)**=2-log DNA-ladder. **M(B)**=100 bp DNA Ladder (NEB). Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

Das gereinigte VHH-Amplifikat wurde anschließend wieder als Matrize in einer Folgereaktion (PCR#2) eingesetzt, durch die flankierende Restriktionsschnittstellen und homologe Sequenzbereiche eingesetzt werden sollten (vergleiche Abbildung 28). Für die Reaktion (3.4.3) wurden erneut 96 Einzelreaktionen durchgeführt und die Oligonukleotide LVHH-pCT-PCR2\_up/lo (Tabelle 3) eingesetzt. Der Erfolg der PCR wurde anschließend wieder durch gelelektrophoretische Analyse (3.4.3) von vier zufällig ausgewählten Einzelreaktionen bestätigt (Abbildung 60 B). Alle Einzelreaktionen wurden erneut vereint und mittels Ethanol-Fällung (3.3.3) gereinigt. Als letztes wurden durch die PCR#3 die homologen Sequenzbereiche komplettiert. Das gereinigte Amplifikat aus PCR#2 wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden pCT\_lib\_fwd/rev (Tabelle 3) verwendet. 192 Einzelreaktionen wurden durchgeführt (3.4.3) und anschließend gelelektrophoretisch (3.3.5) kontrolliert (Abbildung 61). Alle Ansätze wurden vereint und mittels Ethanol-Fällung (3.3.3) gereinigt.

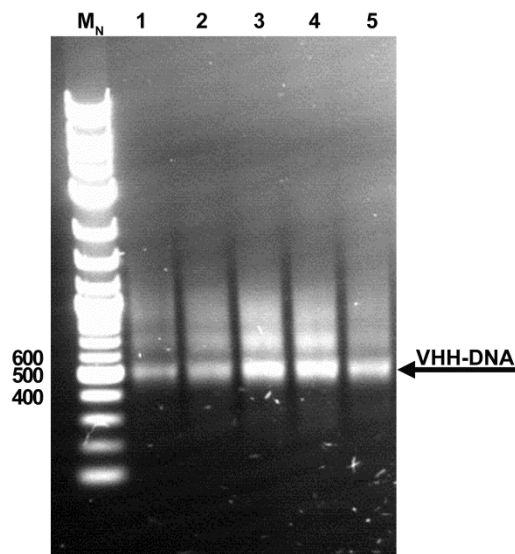


Abbildung 61: Analyse der Agarosegelelektrophorese (1% [w/v]) von PCR#3 zur vollständigen Manipulation und Vervielfältigung der VHH-DNA für die Herstellung der affinitätsgereiften Bibliothek in Hefen. Gezeigt sind fünf zufällig ausgewählte PCR-Ansätze (1-5). Das VHH-Amplifikat (~510 bp) ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.  $M_N = 2\text{-log DNA-ladder}$ . Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

Als Plasmid wurde wieder der Vektor pCT (2.5.2) verwendet. Dieser wurde erneut mittels Restriktionsverdau (3.4.1) und den Restriktionsenzymen *NheI* und *BamHI* linearisiert und dabei das Gen für *McoTI* entfernt (vergleiche 4.1.6.1). Für die Reinigung und Isolierung des linearisierten Vektors wurde dieser ebenfalls über einen Sucrose-Gradienten aufgetrennt (3.3.4). Die Gradienten wurden anschließend in 500  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgefangen und gelelektrophoretisch analysiert (3.3.5). Der gereinigte Vektor wurde dann für die Transformation von EBY100 und die homologe Rekombination mit der VHH-DNA zur Erstellung der VHH-Bibliothek in Hefen eingesetzt.

#### 4.2.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 durch homologe Rekombination zur Erstellung einer durch Immunisierung affinitätsgereiften VHH-Bibliothek

Für die Transformation von EBY100 zur Generierung der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek wurden elektrokompente Hefezellen hergestellt (3.7.2) und zusammen mit linearisiertem Vektor pCT und amplifizierter VHH-DNA für die Elektroporation eingesetzt (3.7.2). Für jede Elektroporation wurden 4  $\mu\text{g}$  Vektor sowie 12  $\mu\text{g}$  VHH-DNA eingesetzt. Insgesamt wurden vier Elektroporationen durchgeführt. Zur anschließenden Evaluierung der Transformationseffizienz wurden entsprechende Verdünnungsplattierungen (SD(-Trp)-Agar;  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$ ) nach Zusammenführen der vier Elektroporationen hergestellt. Durch Auszählen der Kolonien und Berechnung des Mittelwertes wurden die Transformations-Ausbeuten bestimmt.

Tabelle 20: Daten der Elektroporationen zur Herstellung der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen.

Anzahl Elektroporationen	Anzahl Transformanden	Transformanden pro Elektroporation
4	$2,8 \times 10^8$	$7 \times 10^7$

Die Hefezellen wurden nach der Transformation über Nacht in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) und für die Vorbereitung zur Lagerung bei -80 °C anschließend für etwa 72 Std in Low-SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert (3.7.2). Für die Kryokonservierung wurden Aliquots mit mindestens  $5 \times 10^9$  Hefezellen in *freezing solution* (2.10) gelöst und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.3 Validierung der affinitätsgereiften VHH-Hefebibliothek

Um einen ersten Eindruck über den Erfolg der homologen Rekombination zu bekommen, wurde einen Kolonie-PCR mit Hefezellen der Verdünnungsplatten durchgeführt. Zehn Einzelklone wurden willkürlich ausgewählt und zusammen mit den Oligonukleotiden pCT-Lib\_fwd/rev (Tabelle 3) für eine PCR eingesetzt (3.4.4). Die PCR wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.5) und analysiert (Abbildung 62). Außerdem wurden fünf weitere Einzelklone über Nacht in 4 ml SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert (3.2.1) und anschließend die Plasmid-DNA isoliert (3.3.8). Die DNA wurde mit dem Oligonukleotid pCT-Lib-fwd (Tabelle 3) sequenziert und anhand der Sequenzdaten ein *alignment* mit CDR-Längenverteilung erstellt. Dabei wurde wie in den Abschnitten 4.1.4 und 4.1.7 die publizierte VHH-Sequenz <sup>[198]</sup> als Referenz verwendet. Die Auswertung ist in Abbildung 63 und Abbildung 64 dargestellt.

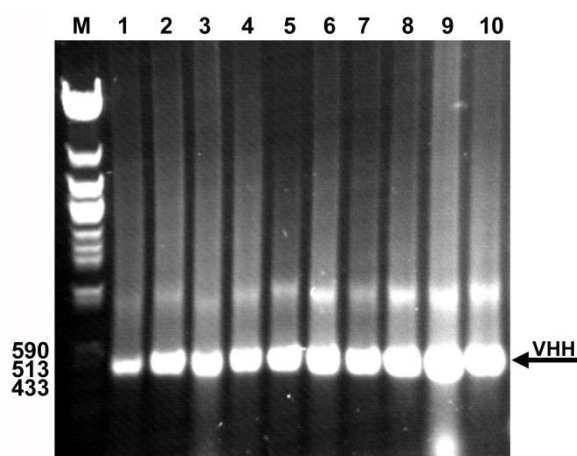


Abbildung 62: Gelelektrophoretische Analyse der Kolonie-PCR mit Hefezellen der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek. Zehn Einzelklone wurden mit den Oligonukleotiden pCT-Lib\_fwd/rev verwendet (1-10). Das VHH-Amplifikat ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Alle Banden laufen in der erwarteten Höhe von etwa 500 bp. M=Lambda DNA/Eco47I (AvaII) Marker. Daneben angegeben sind wichtige Bandenhöhen in Basenpaaren.

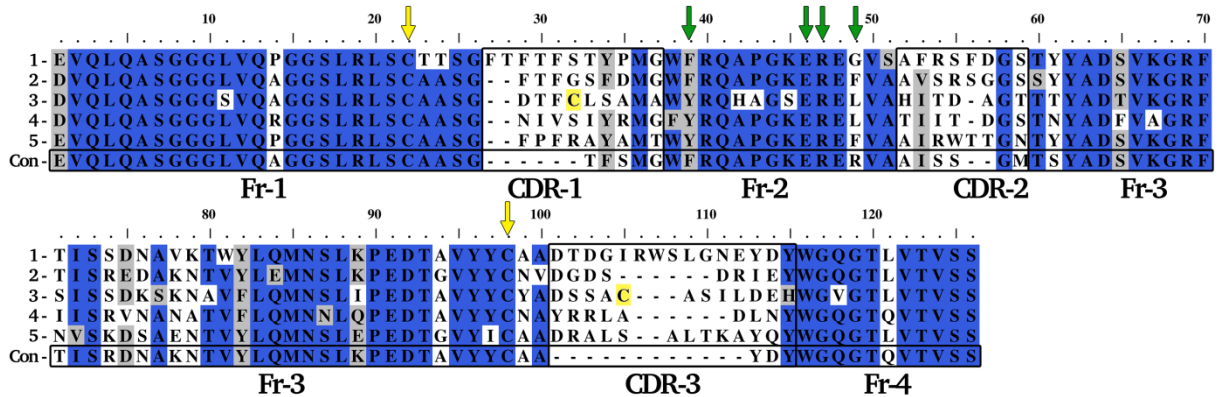


Abbildung 63: Sequenz-Vergleich der fünf zufällig ausgewählten Einzelklone (1-5) aus der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen. Konservierte Bereiche sind blau, Bereiche mit hoher Übereinstimmung grau unterlegt. Die Bedingungen für den *threshold* wurden dabei auf 70 % gesetzt. Die *framework*- sowie CDR-Bereiche sind unterhalb der Sequenzen beschriftet, CDR-Bereiche zusätzlich mit einem schwarzen Kasten umrahmt. Intradomänen-Cysteine sind oberhalb der Sequenzen mit einem gelben Pfeil, zusätzliche Interloop-Cysteine gelb hinterlegt markiert. Grüne Pfeile markieren in VHH-Regionen typische substituierte Aminosäurereste (*hallmarks*)<sup>[44]</sup>. Zusätzlich ist wieder in der letzten Reihe (Con, schwarzer Rahmen) eine publizierte VHH-Sequenz als Vergleich angegeben<sup>[198]</sup>.

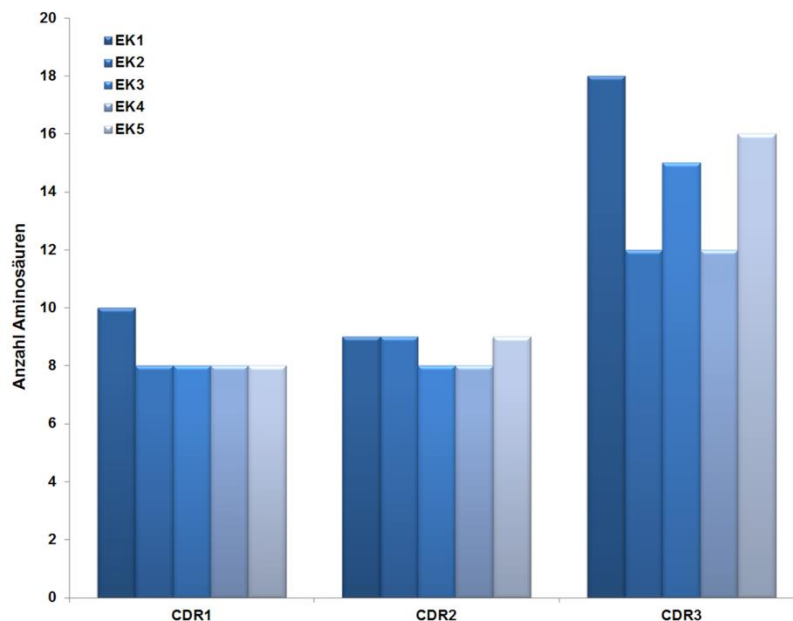


Abbildung 64: CDR-Längenverteilung der fünf sequenzierten Einzelklone (EK1-5) der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek.

Abschließend wurde ein Aliquot der VHH-Bibliothek aufgetaut, in Selektionsmedium kultiviert und die Genexpression induziert (3.2.2). Dann wurde die Zugänglichkeit des Myc-Epitops durch Fluoreszenzmarkierung (3.8.1) und anschließender Analyse im FACS getestet (3.8.2), um die generelle Funktionalität der Oberflächenpräsentation zu überprüfen (Abbildung 65 A). Die Probe wurde außerdem fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Abbildung 65 B zeigt die Überlagerung des FITC- (Autofluoreszenz der Hefezellen) sowie des PE-Signals (Markierung des Myc-Epitops).

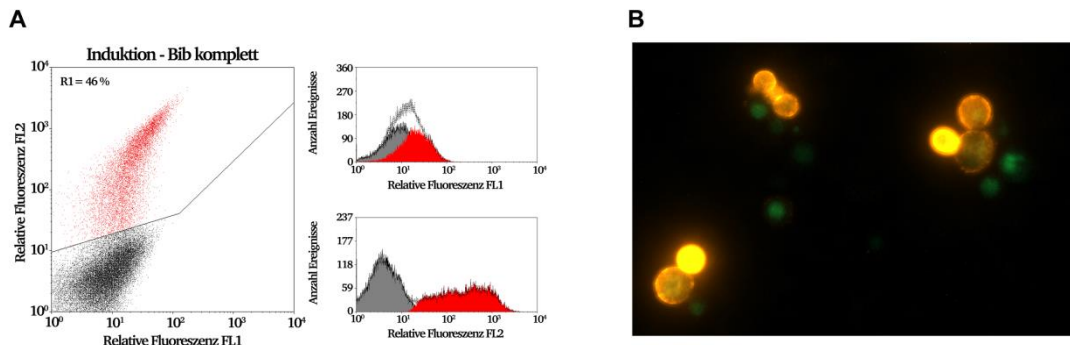


Abbildung 65: Analyse der Zugänglichkeit des auf der Oberfläche präsentierten Myc-Epitops. Als Fluoreszenzmarker wurde SAPE (FL2) verwendet. (A) Dargestellt sind ein zweidimensionaler Dotplot mit logarithmisch aufgetragenen relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Region R1 kennzeichnet die Population positiv markierter Zellen. Daneben sind zusätzlich die beiden Signale der Fluoreszenzkanäle FL1 und FL2 als Histogramme mit den Populationen der Ereignisse aus Region R1 (rot) dargestellt. (B) Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme der gleichen Probe wie in A in 60facher Vergrößerung. Aufnahmen des FITC- sowie des PE-Signals (Myc-Markierung, SAPE) wurden übereinander gelegt.

Abbildung 65 A zeigt, dass 46 % der Zellen (Region R1) eine positive Markierung des Myc-Epitops aufweisen. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse in Abbildung 65 B bestätigt die durchflusszytometrische Messung und zeigt deutlich PE gefärbte Hefezellen mit einem Anteil von etwa 50 % aller vorhandenen Zellen.

#### 4.2.4 Diskussion

Ziel dieses Projektes war es, eine affinitätsgereifte VHH-Antikörper Bibliothek in Hefen für die anschließende Oberflächenpräsentation und Durchmusterung zu erstellen. Die Klonierungs- und Oberflächenpräsentations-Strategie wurde aus dem Projekt unter 4.1.6 übernommen. Anders als in den beiden vorangegangenen Projekten (Abschnitte 4.1) ging hier der Blutentnahme eine Immunisierung des Spendertieres (Tabelle 18) mit einer Reihe von Antigenen (Tabelle 19) und somit eine potentielle *in vivo* Affinitätsreifung voraus. Während der Immunisierung wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 und 39; Tabelle 18) Serum-Proben entnommen, welche immunchemisch auf eine generelle Steigerung der Immunantwort des Tieres untersucht wurden (4.2.1.1). Als Reporter-Antigene wurden hierfür Saglin, huEGFR, mEGFR und EphA2 verwendet, für die alle ein stärkeres Signal im Falle des Postserums gemessen wurde (Abbildung 59). Der direkte Vergleich der Seren auf ihre Nachweisbarkeit durch Protein A-Alkalische Phosphatase-Konjugat sowie den relativen Anteil an enthaltenen Antikörper, zeigte ein identisches Signal (Abbildung 59). Diese Daten deuten somit darauf hin, dass es eine generelle Immunantwort durch die Immunisierung gegeben hat. Eine Aussage über eine HCAB-spezifische Immunantwort konnte dabei nicht gemacht werden, da verschiedene Antikörper-Typen im Serum durch Protein A gebunden werden <sup>[212]</sup>.

Der nächste Schritt beinhaltete die Herstellung der VHH-DNA sowie des Vektors in linearer Form (4.2.1.2). Die extrahierte und translatierte RNA diente als Matrize in einer dreistufigen PCR, die der Amplifizierung und Modifizierung der VHH-DNA diente (Abbildung 60 und Abbildung 61). Der Vektor wurde durch Restriktion linearisiert sowie durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Beide Komponenten konnten in ausreichenden Mengen hergestellt werden und wurden im Anschluss für die Transformation von *S. cerevisiae* EBY100 eingesetzt (4.2.2). Es wurden insgesamt vier Elektroporationen durchgeführt, die anschließend zusammengeführt und gemeinsam behandelt wurden. Die Auswertung der Verdünnungsplattierungen ergab eine Gesamtklonzahl von  $2,8 \times 10^8$  Transformanten und somit eine Transformationseffizienz von  $7 \times 10^7$  je Elektroporation (Tabelle 20), die somit erneut gesteigert werden konnte (vergleiche Tabelle 16). Für eine erste Validierung von Klonierung und Transformation, wurden Einzelklone durch Kolonie-PCR (Abbildung 62) sowie Plasmid-Präparation und anschließender Sequenzierung (Abbildung 63) analysiert. Alle Einzelklone zeigten im Agarosegel eine entsprechende Bande bei etwa 500 bp. Die fünf analysierten Sequenzen waren ebenfalls vollständig in Länge und VHH spezifischen Aminosäuren-Positionen (*hallmarks*). Die CDR-Längenverteilung zeigte ein typisches Muster mit einer längeren CDR3 (Abbildung 64). Die Sequenz des Einzelklons 3 beinhaltete außerdem zwei *inter-loop* Cysteine im Bereich der CDR 1 und 3. Zuletzt wurde die vollständige Bibliothek nach Kultivierung und Induktion der Genexpression erfolgreich auf die Zugänglichkeit des Myc-Epitops getestet, um die Funktionalität der Oberflächenpräsentation zu bestätigen (Abbildung 65).

Für die RNA-Extraktion standen 25 ml Vollblut zur Verfügung, die direkt nach der Blutentnahme in *PAXgene® Blood RNA tubes* (Preanalytix, Heidelberg; 3.6.5) gefüllt wurden. Ausgehend von der Tatsache, dass sich etwa  $3 \times 10^9$  Lymphozyten pro l But befinden und der Anteil an Antikörper produzierenden B-Zellen bei etwa 20 % liegt, von dem wiederum nur 25 % VHHs produzieren, liegt die maximal erreichbare Diversität im Bereich von  $3,5 \times 10^6$ . Da das Spendertier zuvor jedoch immunisiert wurde, war die Zahl der Lymphozyten pro Volumen wahrscheinlich erhöht. Rechnet man zusätzlich noch die PCR bedingten Mutationen ein, die bei der Amplifikation der dreistufigen PCR eingebracht wurden, könnte man also von einer maximal erreichbaren Diversität zwischen  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  ausgehen. Die hier vorliegende Anzahl an Transformanten von  $2,8 \times 10^8$  sollte demnach ausreichen, um das entnommene potentielle Repertoire abzudecken. Die vorliegenden Daten in den Abschnitten 4.2.1-4.2.3 deuten darauf hin, dass eine korrekte VHH-Bibliothek in Hefen erstellt werden konnte, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit für die Durchmusterung eingesetzt wurde.

---

#### 4.2.5 Durchmusterung der affinitätsgereiften VHH-Hefe-Bibliothek mittels FACS

---

Im folgenden Abschnitt wird die Durchmusterung der VHH-Bibliothek nach Bindemolekülen gegen verschiedene, bei der Immunisierung verwendeten, Antigene beschrieben. Die Durchmusterungen wurden ausschließlich am FACS durchgeführt sowie im Rahmen einer Diplomarbeit von Karina Winterling unter Anleitung gemeinsam bearbeitet. Als Antigene wurden der



humane sowie murine EGF-Rezeptor und EphA2 verwendet (Tabelle 4). Dem Induktionsmedium wurde in allen Durchmusterungen PEG8000 zugegeben (3.2.2). Vor jeder Durchmusterung wurde wieder zunächst die Oberflächenpräsentation durch Markierung des Myc-Epitops analysiert (3.8.1, 3.8.2).

---

#### 4.2.5.1 Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen huEGFR

---

Das Antigen huEGFR wurde bereits biotinyliert von der Fa. Merck Darmstadt zur Verfügung gestellt. Der Fluoreszenz-Nachweis von gebundenem Antigen wurde durch SAPE erzielt. Die Durchmusterung wurde zunächst wieder mit einer Endkonzentration des Antigens von etwa 500 nM durchgeführt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Hefezellen sowie nur mit SAPE markierte Zellen im FACS analysiert.

Für die Durchmusterung wurde zunächst ein Aliquot der Hefebibliothek aufgetaut (Kryokultur; -80 °C) und kultiviert sowie anschließend die Genexpression induziert (3.2.2). Vor der Durchmusterung wurde zuerst die Zugänglichkeit des Myc-Epitops analysiert (3.8.1) und sowohl unmarkierte, als auch ausschließlich mit SAPE markierte Hefezellen durchflusszytometrisch kontrolliert (3.8.1). Für die Durchmusterung wurde die affinitätsgereifte VHH-Bibliothek mit biotinyliertem huEGFR (~500 nM Endkonzentration) sowie SAPE (20 µg/ml PBS) markiert (3.8.1) und anschließend  $1 \times 10^8$  Hefezellen sortiert. Es wurden lediglich zwei Runden durchgemustert, wobei nur in Runde eins eine anschließende Rücksortierung durchgeführt wurde.

Abbildung 66 zeigt in Spalte 1 die Markierung des Myc-Epitops mit etwa 40 % der Ereignisse in Region R1 (Induktion 1 – huEGFR). In der anschließenden Durchmusterung wurden etwa 1,1 % der Hefezellen aussortiert (Abbildung 66, Sortierung 1 - huEGFR). Die Region R1 wurde dafür anhand der Negativkontrolle gegen SAPE ausgerichtet (Abbildung 67, Nur SAPE 1 - huEGFR). Im Anschluss wurde gleich eine Rücksortierung durchgeführt, wobei die Stringenz durch Verkleinerung der Region R1 (Y-Achse) erhöht wurde (Abbildung 66, Rücksortierung 1 – huEGFR). In der Rücksortierung wurden etwa 10 % der Hefezellen aussortiert. Nach erneuter Kultivierung der aussortierten Hefezellen und der Induktion der Genexpression (3.2.2), wurde erneut die Zugänglichkeit des Myc-Epitops analysiert (3.8.1). Außerdem wurde die Gesamtpopulation wieder auf ihre Bindeeigenschaft gegen SAPE kontrolliert (3.8.1). Für die Durchmusterung wurden die Zellen wie in Runde eins mit 500 nM huEGFR inkubiert und mit SAPE fluoreszenzmarkiert (3.8.1).



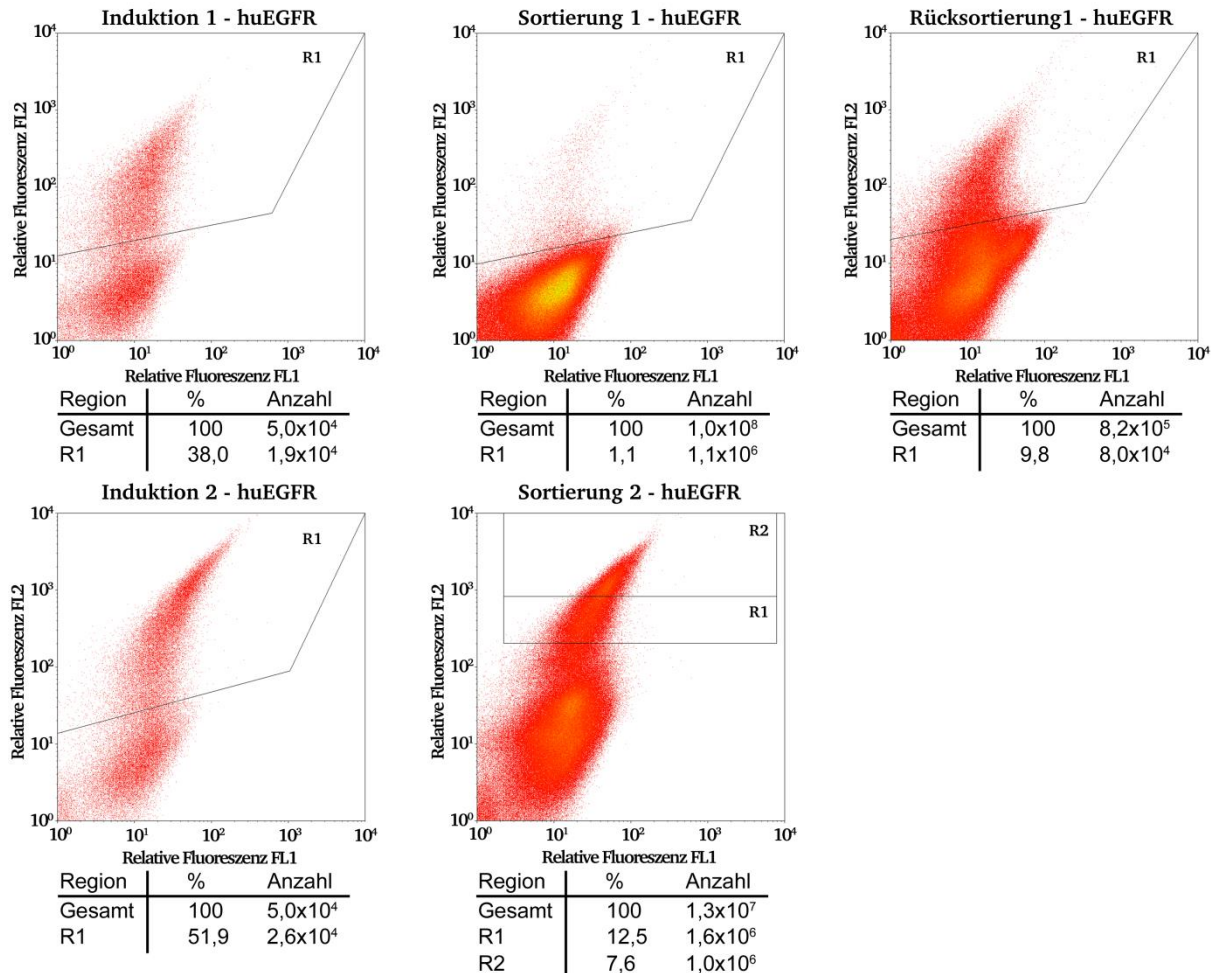


Abbildung 66: Daten der FACS gestützten Durchmusterung der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen humanes EGFR. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Sortierungsrunden sind waagrecht untereinander angeordnet. In Spalte 1 ist die Induktions-Analyse, in Spalte 2 die Sortierung und in Spalte 3 die Rücksortierung dargestellt. Region R1 und R2 kennzeichnen in allen Sortierungen und Rücksortierungen die Region der aussortierten Hefezellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

Die Kontrolle der Zugänglichkeit des Myc-Epitops in Abbildung 66 (Induktion 2 – huEGFR) zeigt einen Anteil an fluoreszenzmarkierten Zellen von etwa 50 %. Die Negativkontrolle mit SAPE (Abbildung 67, Nur SAPE 2 - huEGFR) zeigt erneut keine markierten Hefezellen in der Gesamtpopulation (0,3 %). Bei der Durchmusterung wurden zwei Regionen (Abbildung 66, R1 und R2) gelegt und separat sortiert. Insgesamt konnte der Anteil an huEGFR bindenden Hefezellen auf über 50 % angereichert werden. Der Anteil an aussortierten Zellen in der Region R1 betrug etwa 12 %, in Region R2 etwa 8 % (Abbildung 66, Sortierung 2 - huEGFR). Die Hefezellen wurden anschließend in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) überführt, wobei ein kleiner Teil direkt auf SD(-Trp)-Agar (2.9.2) ausplattiert wurde, um Einzelklone analysieren zu können.

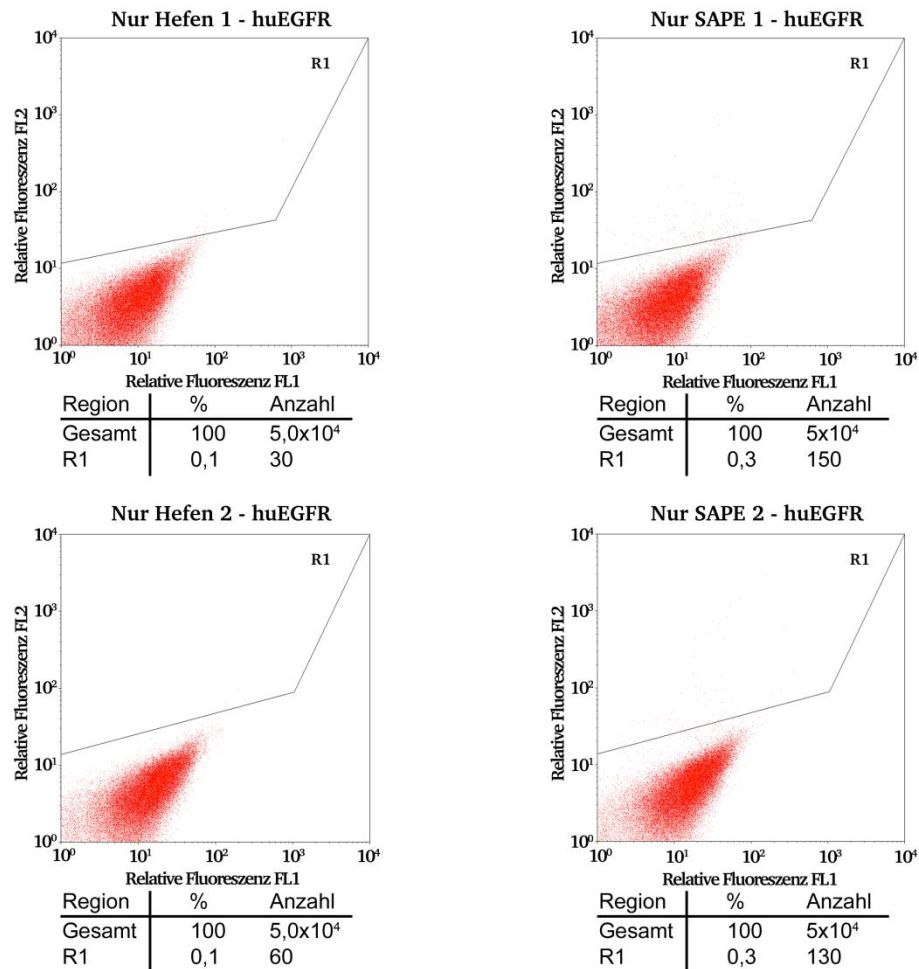


Abbildung 67: Daten der zur Durchmusterung nach huEGFR bindenden Hefezellen durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Die Analysen der unmarkierten Hefezellen sind in Spalte 1, die Negativkontrollen gegen SAPE in Spalte 2 dargestellt. Die Region R1 kennzeichnen in allen Dotplots die Region unerwünscht markierter Zellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

Nach 72 Std Inkubation bei 30 °C waren lediglich Hefezellen auf der Agar-Platte der Sortierung aus Region R1 gewachsen (vergleiche Abbildung 66, Sortierung 2). Auf der Agar-Platte der Sortierung aus Region R2 konnten keine Kolonien identifiziert werden. Für Einzelklon-Analysen wurden deshalb Hefezellen von 10 Kolonien der Agar-Platte „Region R1“ kultiviert sowie die Genexpression induziert (3.2.2).

#### 4.2.5.2 Analyse der huEGFR bindenden Einzelklone

Für die Analyse der Einzelklone wurde zunächst die Zugänglichkeit des Myc-Epitops untersucht (3.8.1, 3.8.4) und, im Falle einer positiven Markierung, die Bindung an huEGFR (1  $\mu$ M) getestet (3.8.1, 3.8.4). Um eine unspezifische Bindung ausschließen zu können, wurden zusätzlich Kontrollen mit biotinyliertem Erbitux (800 nM, Tabelle 4) und SAPE (20  $\mu$ g/ml PBS) durchgeführt (3.8.1, 3.8.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 68 dargestellt.

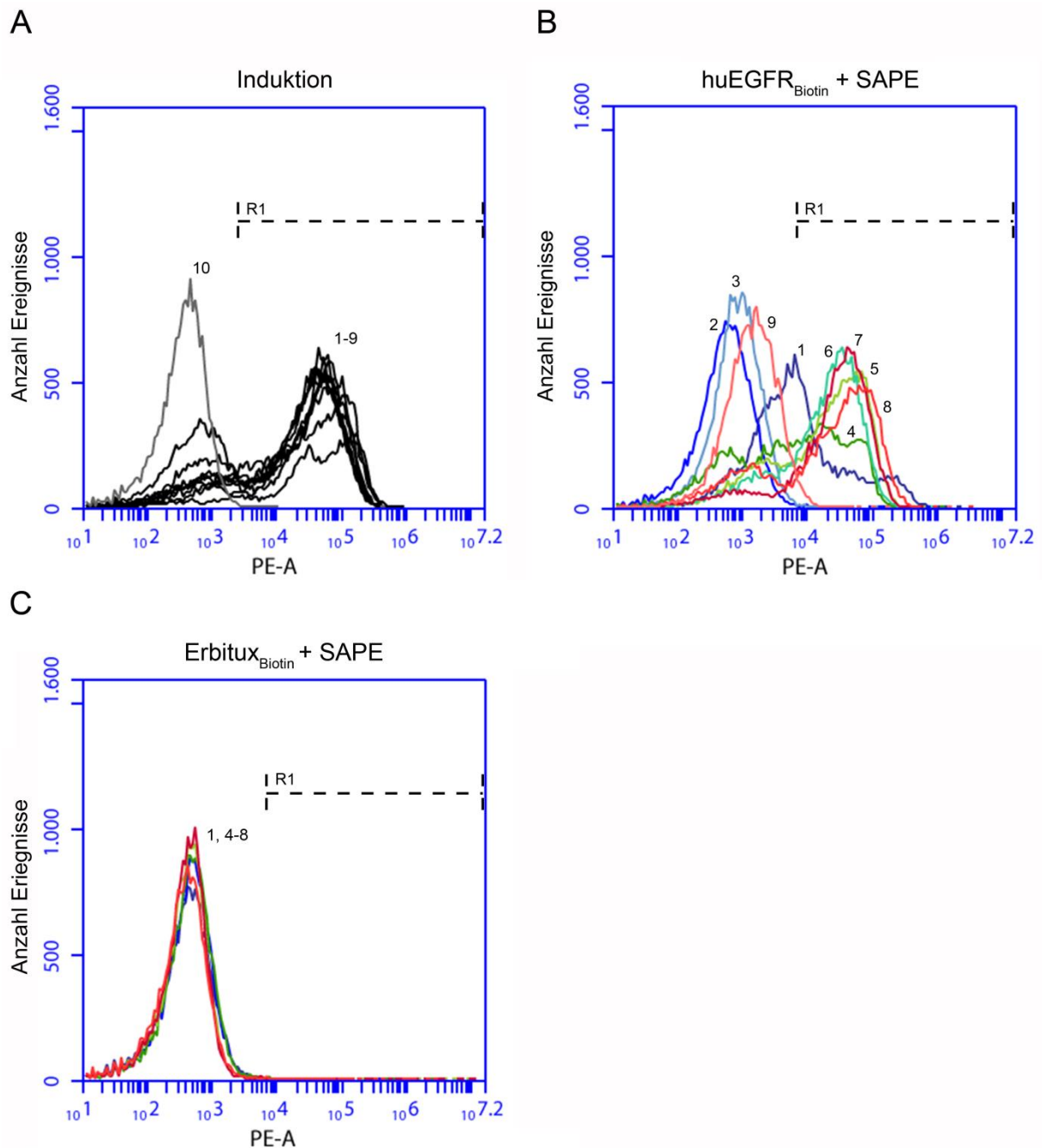


Abbildung 68: Daten der ersten Bindungstests der Einzelklone 1-10 aus der Durchmusterung gegen huEGFR. Dargestellt sind Histogramme des Signals des Fluoreszenzkanals FL2 (PE). Die Regionen R1 beinhalten in allen Messungen die positiv markierten Hefezellen. Abbildung A zeigt die Analyse des Myc-Epitops (Ereignisse in Region R1: EK1=44,2%, EK2=67,0%, EK3=77,8%, EK4=87,0%, EK5=74,7%, EK6=72,9%, EK7=76,0%, EK8=70,4%, EK9=67,3%, EK10=0,4%), Abbildung B die Markierung mit biotinyliertem huEGFR und SAPE (Ereignisse in Region R1: EK1=44,9%, EK2=0,4%, EK3=0,3%, EK4=46,5%, EK5=71,4%, EK6=72,6%, EK7=73,8%, EK8=67,7%, EK9=2,6%) und Abbildung C die Negativkontrolle mit Erbitux<sub>Biotin</sub> und SAPE (Ereignisse Region R1: EK1 und 4-8 = <0,6%). Es wurden je  $2 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

Das Myc-Epitop konnte bei den Einzelklonen eins bis neun erfolgreich markiert werden. Lediglich Einzelklon zehn zeigte kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 68 A). Bei der anschließenden Markierung mit huEGFR<sub>Biotin</sub> und SAPE zeigten nur die Klone eins sowie vier bis acht ein

Fluoreszenzsignal (Abbildung 68 B). Diese zeigten alle in der Kontroll-Markierung mit Erbix<sub>Biotin</sub> und SAPE kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 68 C). Im Anschluss wurden die Klone vier bis sechs erneut kultiviert sowie die Genexpression induziert (3.2.2). Es wurde wieder eine Kontrolle mit SAPE sowie eine Kontrolle mit Anti-Maus-FITC Konjugat durchgeführt (3.8.1). Anschließend wurden die drei Einzelklone mit 1  $\mu$ M huEGFR<sub>Biotin</sub> und SAPE sowie mit Anti-Myc-Antikörper und Anti-Maus-FITC Konjugat markiert (3.8.1). Die Analyse wurde erneut im Accuri-Durchflusszytometer durchgeführt (3.8.4).

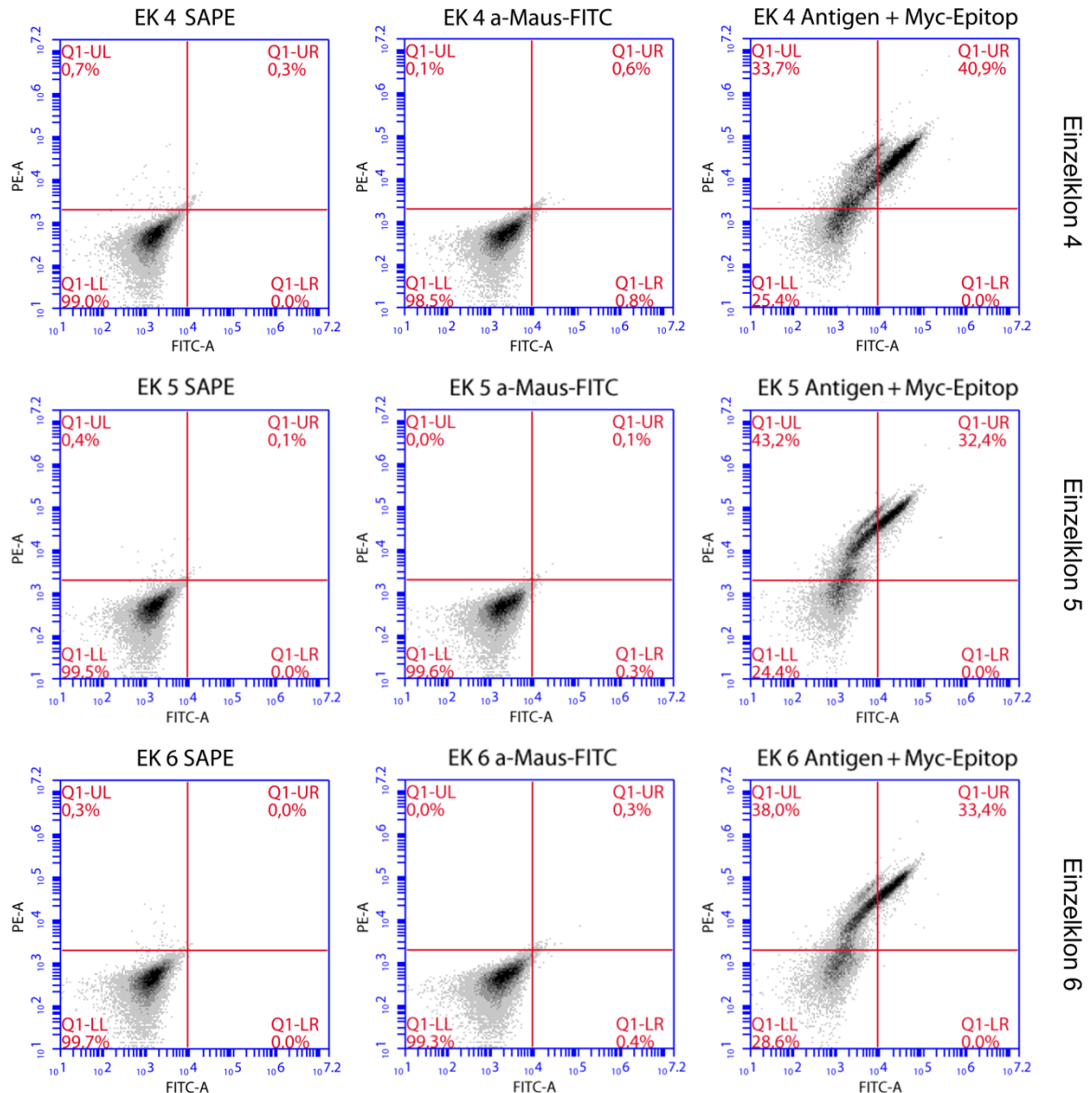
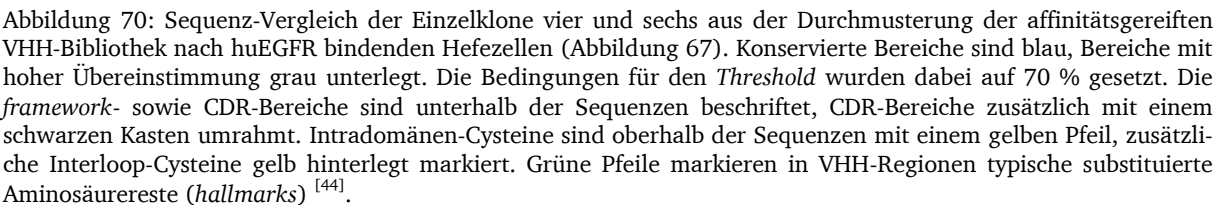


Abbildung 69: Daten der Wiederholung der Einzelklon-Analyse von Einzelklon 4-6 aus der Durchmusterung gegen huEGFR aus der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit den Fluoreszenzkanälen FL1 (FITC) und FL2 (PE). Die SAPE-Kontrolle (Spalte 1) wurde ausschließlich mit SAPE (20  $\mu$ g/ml PBS), die Anti-Maus-FITC-Kontrolle (Spalte 2) nur mit Anti-Maus-FITC Konjugat (20  $\mu$ g/ml PBS) inkubiert. In Spalte 3 sind Markierungen dargestellt, die sowohl mit huEGFR-Biotin (1  $\mu$ M in PBS) und SAPE (20  $\mu$ g/ml PBS), als auch mit Anti-Myc-Antikörper und Anti-Maus-FITC Konjugat (je 20  $\mu$ g/ml PBS) inkubiert wurden. Alle relevanten Prozentangaben sind im jeweiligen Dotplot angegeben. Es wurden je  $2 \times 10^4$  Ereignisse im Accuri-Durchflusszytometer gemessen.

Für weitere Untersuchungen der Einzelklone wurde die DNA aus den Hefezellen isoliert (3.3.8) und für eine ausreichende Amplifikation der Plasmid-DNA *E. coli* DH5 $\alpha$  damit transformiert (3.1.4). Nach Kultivierung der Transformanten (3.1.2) und DNA-Präparation aus DH5 $\alpha$  (3.3.7.1), wurde die Plasmid-DNA mit dem Oligonukleotid pCT-Seq\_up (Tabelle 3) sequenziert. Die Sequenzierung für Einzelklon fünf war nicht erfolgreich, die Sequenzdaten der Einzelklone vier und sechs wurden mittels BioEdit miteinander verglichen. Wie in Abbildung 70 gezeigt, gleichen sich beide Sequenzen bis auf zwei Aminosäuren. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren an Position eins (Aspartat [D] bzw. Glutamat [E]) und an Position 110 (Tyrosin [Y] bzw. Serin [S]). Die einzelnen Abschnitte der VHH-Sequenz (*framework*- und CDR-Bereiche) sind vollständig und zeigen die typischen Merkmale (*hallmarks*, grüne Pfeile; Intradomänen-Cysteine, gelbe Pfeile). Die Sequenz des Myc-Epitops am C-Terminus der Sequenz ist intakt (Myc, schwarzer Balken). Zusätzlich zu den beiden Intradomänen-Cysteinen besitzen beide Sequenzen zwei Interloop-Cysteine (Position 50 und 105, gelb hinterlegt).



157



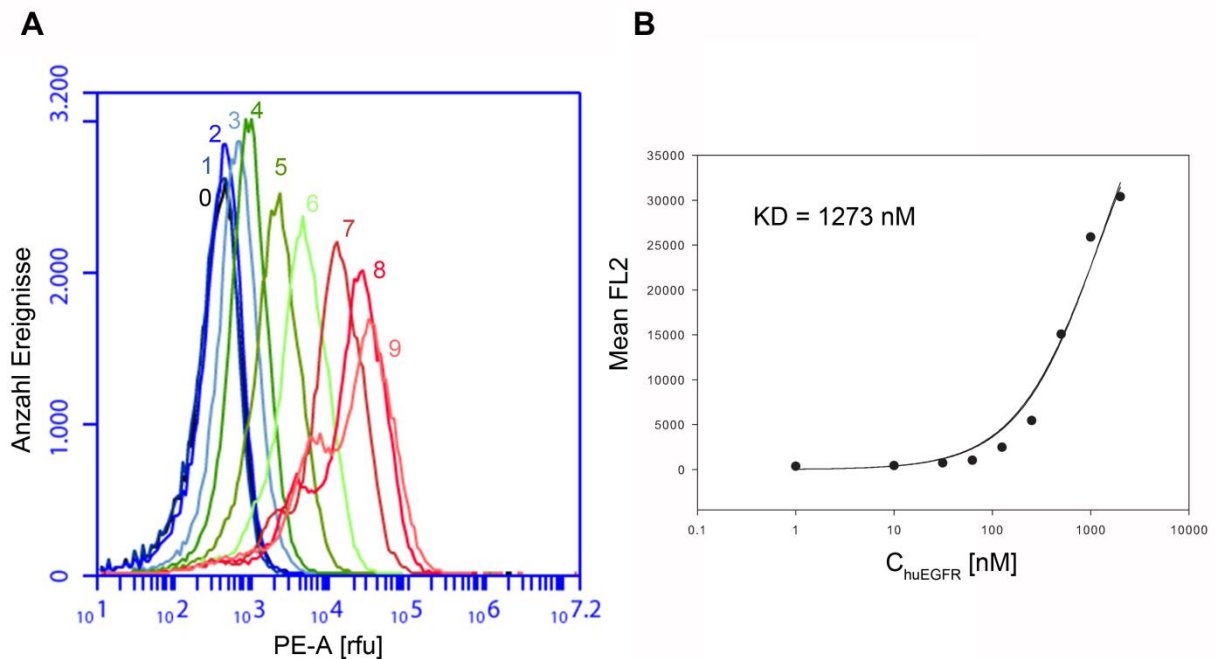


Abbildung 71: Daten der durchflusszytometrischen Analyse für die Titration auf Hefezellen zur Ermittlung der Affinitätskonstante des VHH-Antikörpers EK4 gegen huEGFR. 10 Aliquots wurden mit ansteigenden Konzentrationen an huEGFR<sub>Biotin</sub> (0=0 nM, 1=1 nM, 2=10 nM, 3=31,25 nM, 4=62,5 nM, 5=125 nM, 6=250 nM, 7=500 nM, 8=1.000 nM und 9=2.000 nM) inkubiert sowie mit 10  $\mu\text{g/ml}$  SAPE fluoreszenzmarkiert und gemessen. Dargestellt sind die Einzelmessungen der FACS-Analyse zusammengefasst in einem Histogramm mit den Daten des Fluoreszenzkanals FL2 (PE-A) (A) und die Mean-Werte der Einzelmessungen in Korrelation mit den eingesetzten Antigenkonzentrationen sowie die daraus berechnete Regressionsgerade (B). Die errechnete Affinitätskonstante ( $K_D$ ) von 1273 nM ist ebenfalls im Graph angegeben.

#### 4.2.5.3 Zusätzliche Sortierungen nach huEGFR bindenden Hefezellen

Da in der Durchmusterung nach huEGFR bindenden Hefezellen (4.2.5.1) eine deutliche Anreicherung bereits nach der ersten Sortierung erzielt werden konnte, sollte zusätzlich versucht werden, durch Verringerung der Antigenkonzentration Binder mit niedrigeren Affinitätskonstanten zu isolieren. Hierfür wurde ein Aliquot der Hefen aus der ersten Durchmusterungsrunde (Abbildung 66) aufgetaut (Kryokultur;  $-80^\circ\text{C}$ ) und die Hefezellen kultiviert sowie die Genexpression induziert (3.2.2). Nach Analyse des Myc-Epitops sowie der Kontrolle mit SAPE (3.8.1) wurde die Antigen-Markierung mit 100 nM bzw. 1 nM biotinyliertem huEGFR durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte wieder mit SAPE (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Durchmusterung wurde am MoFlo Sortiergerät durchgeführt (3.8.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 72 dargestellt.

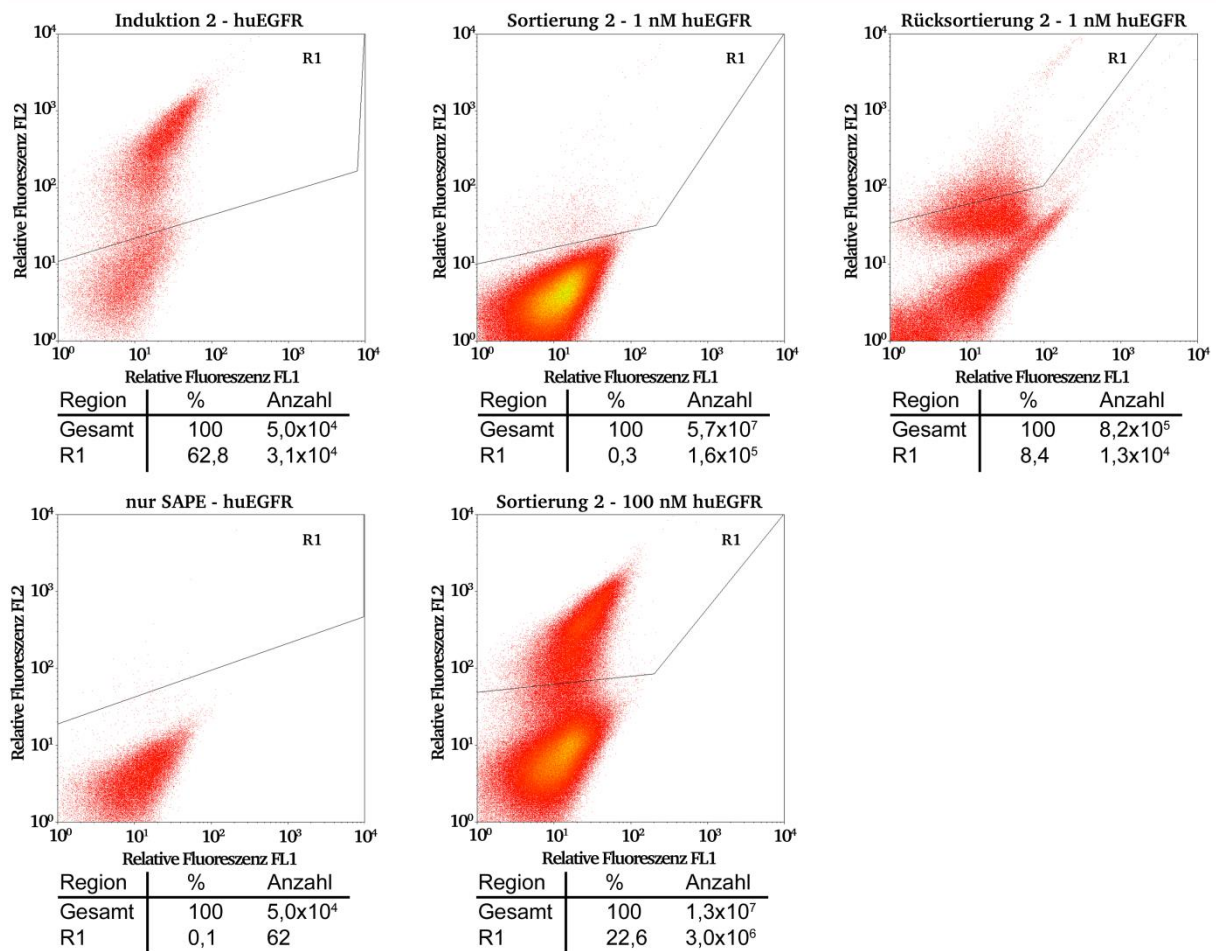


Abbildung 72: Daten der zusätzlichen FACS gestützten Durchmusterung nach Bindern gegen humanen EGFR unter Verwendung verringerter Antigen-Konzentrationen. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). In Spalte 1 ist die Induktions-Analyse (Reihe 1) sowie die Kontrolle mit SAPE (Reihe 2) dargestellt. In Spalte 2 sind die Sortierung mit 1 nM huEGFR (Reihe 1) bzw. 100 nM (Reihe 2), in Spalte 3 die Rücksortierung mit 1 nM huEGFR gezeigt. Region R1 kennzeichnet in allen Sortierungen und Rücksortierungen die Region der aussortierten Hefezellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

Die erneute zweite Runde der Durchmusterung gegen huEGFR mit 100 nM Antigen (Abbildung 72, Sortierung 2 - 100 nM huEGFR) zeigt eine ähnlich große Population wie in der unter 4.2.5.1 durchgeführten Durchmusterung mit 500 nM huEGFR (siehe Abbildung 66). Es wurde daher auf eine direkte Rücksortierung verzichtet. Bei der Markierung mit nur 1 nM huEGFR (Abbildung 72, Sortierung 2 - 1 nM huEGFR) lag die Populationsgröße lediglich im Bereich der Kontrolle gegen SAPE (Abbildung 72, nur SAPE - huEGFR). Hier wurde eine direkte Rücksortierung durchgeführt (Abbildung 72, Rücksortierung 2 - 1 nM huEGFR), bei dem das Sortierungskriterium (Region R1) stringenter gesetzt wurde.

Anschließend wurden die aussortierten Hefezellen der beiden Durchmusterungen in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert und die Genexpression für eine dritte Durchmusterungsrunde induziert (3.2.2). Für die dritte Runde mit verringerter Antigenkonzentration wurde vorab sowohl die Zugänglichkeit des Myc-Epitops, als auch die Bindung von SAPE kontrolliert



(3.8.1, 3.8.2). Die Ergebnisse für die Myc-Kontrolle sind in Abbildung 74 (Spalte eins), die Daten für die SAPE-Kontrolle in Abbildung 73 zusammengefasst.

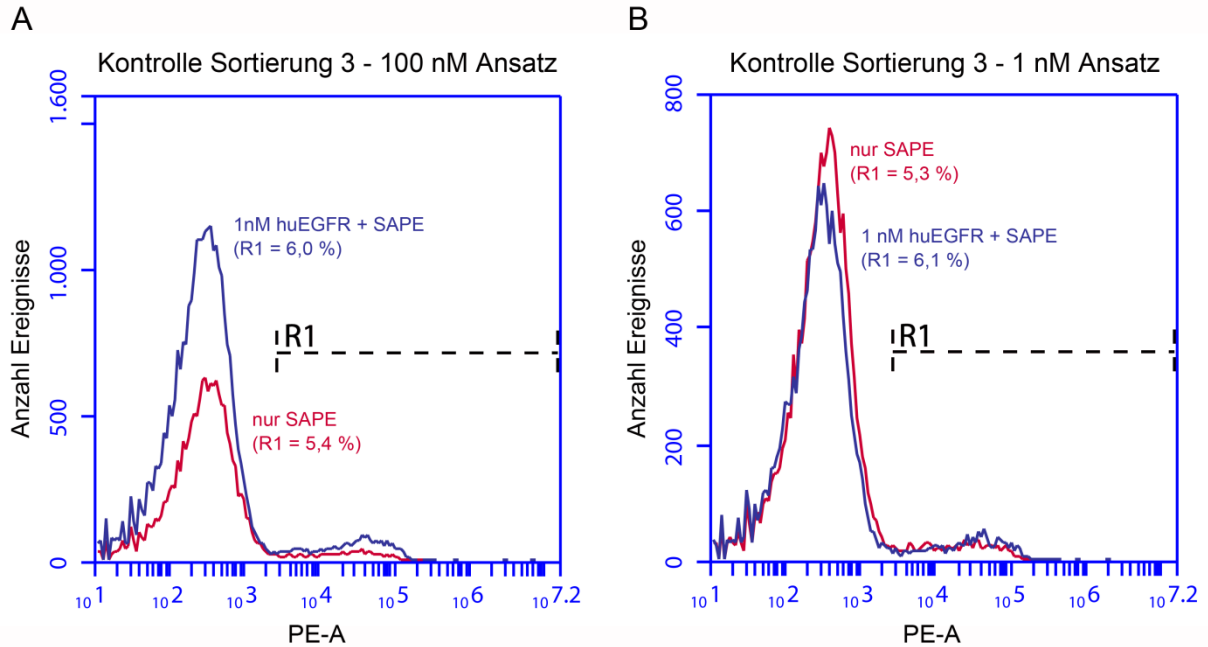


Abbildung 73: Daten der Kontrollen nach SAPE bindenden Hefezellen der Durchmusterungsrunde drei nach huEGFR Bindern mit verringerten Antigenkonzentrationen. Dargestellt sind Histogramme mit logarithmisch aufgetragener, relativer Fluoreszenz des PE-Signals (FL2). Die Ansätze mit 100 nM (A) bzw. 1 nM (B) Antigen in Runde zwei wurden separat gemessen und auf ihre Bindung von SAPE sowie huEGFR<sub>Biotin</sub> überprüft. Die Region R1 kennzeichnet den Bereich der fluoreszenzmarkierten Hefezellen. Prozentangaben sind innerhalb der Histogramme angegeben.

Die Myc-Kontrolle in Abbildung 74 zeigt bei beiden Ansätzen (100 nM bzw. 1 nM aus Runde zwei, Abbildung 72) eine deutliche Population an Hefezellen (~30 %) mit markiertem Myc-Epitop. Die Kontrolle mit SAPE zeigt im Vergleich mit huEGFR<sub>Biotin</sub> und SAPE jedoch eine Population fast gleicher Größe (Abbildung 73). Eine dritte Durchmusterungsrunde wurde dennoch durchgeführt und hierfür beide Ansätze mit 1 nM huEGFR<sub>Biotin</sub> inkubiert und anschließend mit SAPE fluoreszenzmarkiert (3.8.1). Mit beiden Ansätzen wurde eine Sortierung und anschließend eine Rücksortierung durchgeführt (3.8.2). Die Daten sind in Abbildung 74 zusammengefasst.

Bei beiden Sortierungen wurde das Sortierungskriterium (Region R1) so gesetzt, dass möglichst viele Ereignisse aussortiert wurden (Abbildung 74, Spalte zwei). In der Rücksortierung wurden die Region R1 jeweils stringenter gesetzt, um eine Anreicherung an stärker markierten Zellen zu erreichen (Abbildung 74, Spalte drei). Hefezellen aus beiden Sortierungen wurden im Anschluss auf SD(-Trp)-Agar (2.9.2) ausgebracht und bei 30 °C inkubiert. Nach etwa 72 Std wurden jeweils zwei Einzelklone in Flüssigmedium kultiviert sowie die Genexpression induziert (3.2.2), um sie auf ihre Bindeeigenschaften hin zu untersuchen.

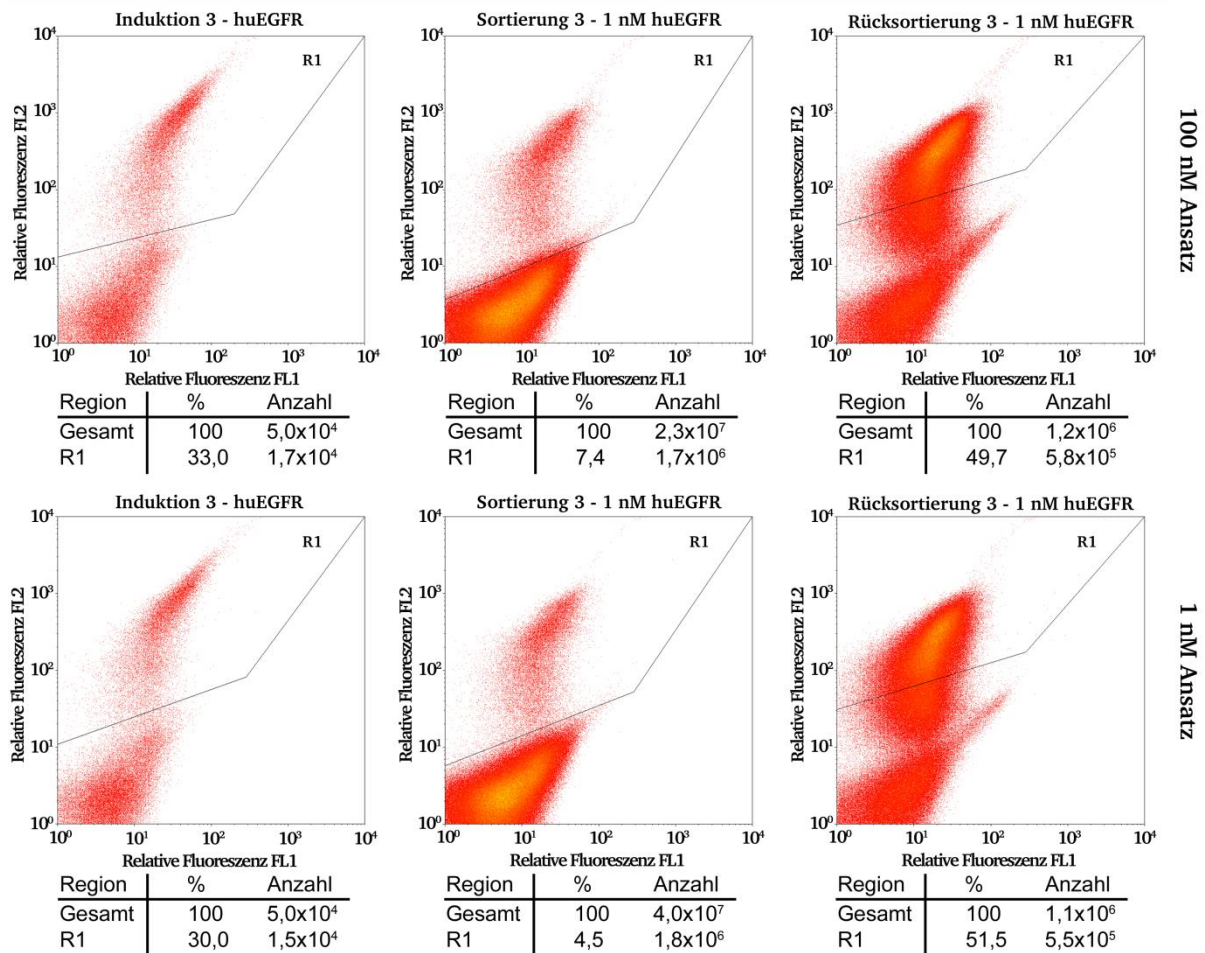


Abbildung 74: Daten der zusätzlichen FACS gestützten Durchmusterung nach Bindern gegen den humanen EGFR unter Verwendung verringerter Antigen-Konzentrationen aus Runde drei. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). In Spalte eins ist die Induktions-Analyse, in Spalte zwei die Sortierungen mit 1 nM huEGFR, in Spalte drei die Rücksortierung mit 1 nM huEGFR gezeigt. Dabei sind die Daten des 100 nM Ansatzes in Reihe eins, die des 1 nM Ansatzes in Reihe zwei angeordnet. Region R1 kennzeichnet in allen Sortierungen und Rücksortierungen die Region der aussortierten Hefezellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

#### 4.2.5.4 Analyse von Einzelklonen der zweiten Durchmusterung nach huEGFR bindenden Hefezellen

Die zuvor in Galaktose haltigem Medium kultivierten (3.2.2) vier Einzelklone (siehe 4.2.5.3) wurden zunächst zur Kontrolle der Induktion (Myc-Epitop) sowie ihrer Bindeeigenschaften gegenüber des Fluoreszenzmarkers SAPE entsprechend markiert (3.8.1) und durchflusszytometrisch analysiert (3.8.4). Dabei wurden zum Vergleich ebenfalls nicht markierte Zellen gemessen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 75 zusammengefasst.

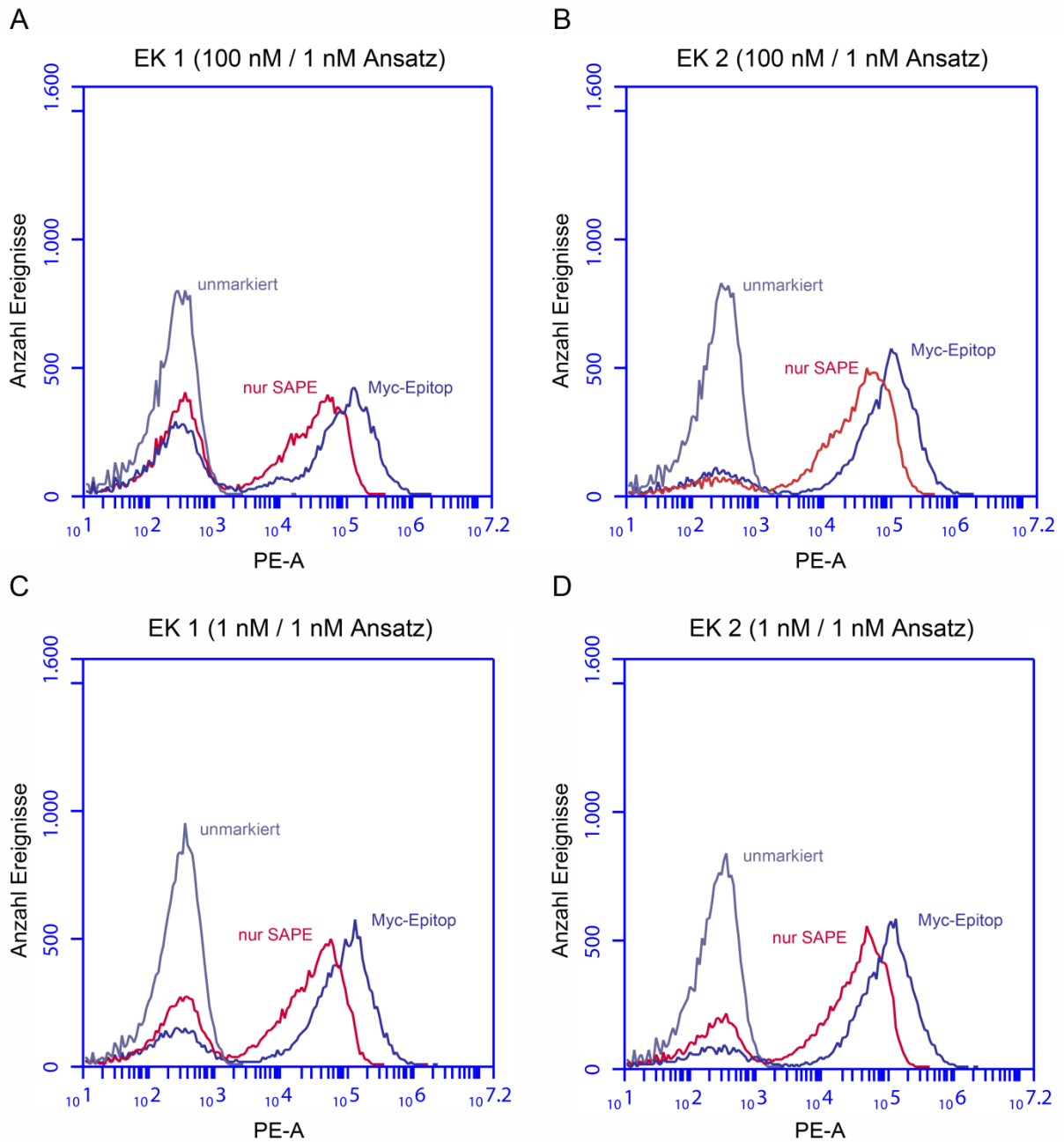


Abbildung 75: Daten der Analysen der jeweiligen Einzelklone aus den zusätzlichen Durchmusterungen gegen huEGFR. Dargestellt sind Histogramme des Signals des Fluoreszenzkanals FL2 (PE). Aufgeführt sind die Einzelklone aus der Durchmusterung mit 100 nM huEGFR (Abbildung A und B) sowie mit 1 nM huEGFR (Abbildung C und D) in der zweiten Runde. Es wurden jeweils unmarkierte Hefen, das Myc-Epitop sowie die Bindung von SAPE analysiert. Es wurden je  $2 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

Alle vier Einzelklone zeigen sowohl eine starke Markierung des Myc-Epitops, als auch eine fast ebenso intensive Fluoreszenzsignal durch die Markierung mit SAPE (Abbildung 75 A-D). Da eine Bindung an den Fluoreszenzmarker nachgewiesen wurde, wurde in allen vier Fällen auf die Markierung mit huEGFR verzichtet und die Einzelklone verworfen.

---

#### 4.2.5.5 Diskussion der Ergebnisse

---

In der Durchmusterung der *in vivo* affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen nach Bindern gegen den humanen EGF-Rezeptor (huEGFR) konnte bereits nach einer Runde eine Anreicherung auf 50 % positiv markierte Hefezellen erzielt werden (Abbildung 66). Die anschließende Analyse der Einzelklone bestätigte dieses Resultat mit 60 % huEGFR spezifischen Hefeklonen (4.2.5.2). Zwei der Einzelklone (vergleiche Abbildung 69, EK 4 und 6) wurden eingehender analysiert. Die Sequenzanalyse zeigte eine 97,34 prozentige Übereinstimmung. Lediglich die Positionen eins und 110 der der VHH-Sequenz zeigten unterschiedliche Aminosäuren, wobei Position 110 dem C-Terminus der CDR-3 entspricht.

Für Einzelklon vier wurde die Affinitätskonstante durch Titration auf Hefezellen ermittelt und auf 1,2  $\mu$ M bestimmt (Abbildung 71). Im Vergleich mit den ermittelten Affinitäten der Einzelklone aus der naiven VHH-Bibliothek ist dieser Wert bereits niedriger (vergleiche 4.1.9.6 und 4.1.9.9). Dennoch war aufgrund der starken Anreicherung in Runde eins zu vermuten, dass durch Verwendung niedrigerer Antigenkonzentrationen weitaus affinere Einzelklone isoliert werden könnten. Aus diesem Grund wurde ausgehend von der bereits durchmusterten Bibliothek nach Runde eins (Abbildung 66) eine neue zweite Durchmusterungsrunde durchgeführt, in der verringerte Antigenkonzentrationen eingesetzt wurden (4.2.5.3). Verglichen mit der Negativkontrolle mit SAPE (Abbildung 72, nur SAPE) zeigte sich der Ansatz mit 1 nM eingesetztem huEGFR als weniger vielversprechend (Abbildung 72, Reihe eins), da sich die Fluoreszenzsignale nicht sichtbar voneinander unterschieden. Anders jedoch in der Sortierung mit 100 nM huEGFR, in der etwa 23 % (Region R1) der Zellen ein Fluoreszenzsignal zeigten (Abbildung 72, Reihe zwei). In Runde drei wurde bei beiden Ansätzen 1 nM huEGFR eingesetzt. Jedoch bereits die vorab durchgeführte Negativkontrolle mit SAPE und der Vergleich mit 1 nM huEGFR und SAPE (Abbildung 73) zeigte eine hohe Übereinstimmung der beiden Signale, was vermuten ließ, dass die Konzentration von 1 nM zu niedrig für die Durchmusterung war. Die anschließende Einzelklonanalyse bestätigte diese Annahme (4.2.5.4). Alle vier getesteten Einzelklone zeigten eine Bindung an SAPE.

Aus Zeitgründen konnte an dieser Stelle die Durchmusterung mit 100 nM huEGFR nicht mehr aufgegriffen und mit Antigenkonzentrationen größer 1 nM durchgeführt werden. Jedoch lassen die Daten der Durchmusterung mit 100 nM Antigen in Abbildung 72 vermuten (vergleiche Sortierung 2 - 100 nM huEGFR und nur SAPE - huEGFR), dass hier ein Potential an möglichen Bindern mit besseren Bindeeigenschaften zu finden ist, als in der ersten Durchmusterung gegen huEGFR (4.2.5.1, 4.2.5.2).

#### 4.2.5.6 Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen EphA2

Als zweite Durchmusterung der affinitätsgereiften VHH-Bibliothek in Hefen wird hier das Projekt zur Isolierung von Bindemolekülen gegen den Epinephrin-Rezeptor 2 (siehe 1.7) vorgestellt. Die Arbeiten zu diesem Projekt wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit Karina Winterling im Rahmen ihrer von mir betreuten Diplomarbeit angefertigt (vergleiche Abschnitt 4.1.9.8).

Das Antigen für dieses Projekt, EphA2 (R&D Systems; Tabelle 4), verfügte über ein Hexahistidin-Epitop, weshalb hier die Fluoreszenzmarkierung trotz des etwas schwächeren Signals mittels Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (Tabelle 4) durchgeführt wurde. Im Folgenden werden die beiden Durchmusterungsrunden beschrieben, in denen jeweils vor der Sortierung die Zugänglichkeit des Myc-Epitops analysiert sowie die Bindung an Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> kontrolliert wurde. Das Antigen EphA2 wurde in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt. Auf eine niedrigere Antigen-Konzentration wurde aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität des Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Konjugats verzichtet. In beiden Runden wurden eine Sortierung und eine anschließende Rücksortierung durchgeführt.

Für die Durchmusterung wurde ein Aliquot aufgetaut (Kryokultur; -80 °C) und in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert sowie anschließend die Genexpression induziert (3.2.2). Für die Kontrolle des Myc-Epitops sowie der Bindung durch den Fluoreszenzmarker Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub>, wurden die Aliquots von  $10^7$  Hefezellen entsprechend mit einer 10 µg/ml enthaltenden Lösung markiert (3.8.1). Für die Durchmusterung wurden etwa  $5 \times 10^8$  Hefezellen zunächst mit 500 nM EphA2 und anschließend mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (10 µg/ml PBS) inkubiert (3.8.1). Die Sortierung der Zellen erfolgte im MoFlo Sortiergerät (3.8.2).

Abbildung 76 zeigt die Daten der Analysen und der Sortierung der ersten Durchmusterungsrunde gegen EphA2. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen durch Markierung des Myc-Epitops lag bei etwa 30 % (Abbildung 76, oben links). Eine initiale Population an Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> Bindern konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 76, oben rechts). Der Anteil an aussortierten Hefezellen war mit 0,1 % sehr gering (Abbildung 76, unten links). In der Rücksortierung (Abbildung 76, unten rechts) zeigten sich jedoch zwei Populationen in der Region R2, wobei die untere langgestreckte Population mit Ereignissen im Fluoreszenz-Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^4$  rfu des FL1-Kanals (FITC) auf eine deutliche Markierung durch Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> hindeutete. Die aussortierten Hefezellen wurden anschließend wieder in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert (3.2.2).

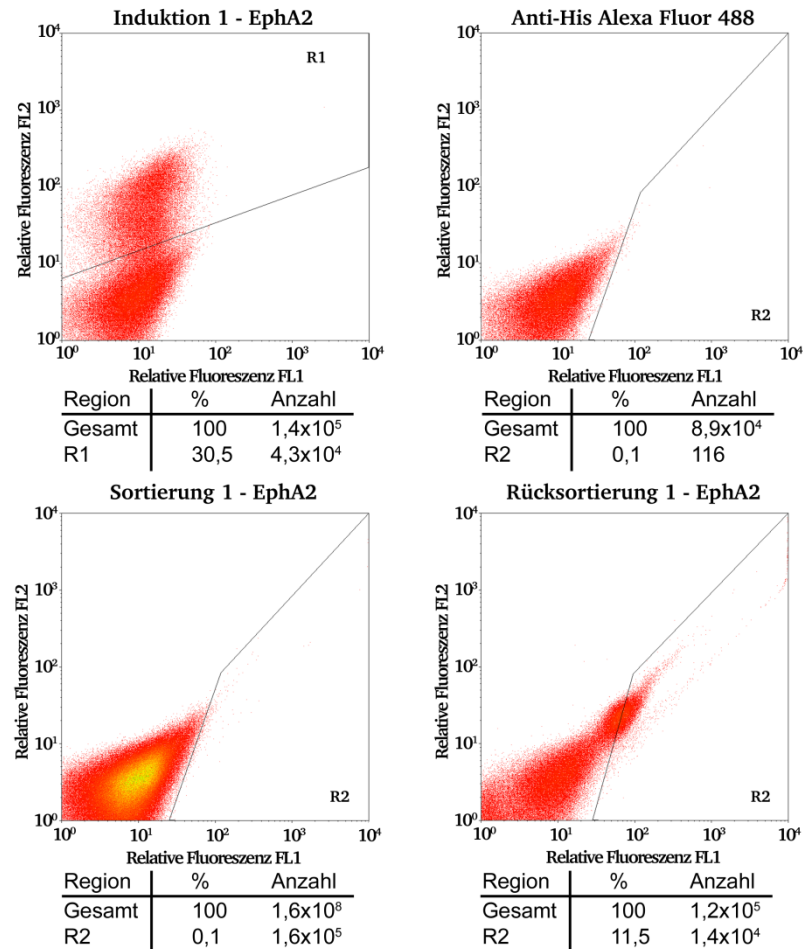


Abbildung 76: Daten der ersten Runde der FACS gestützten Durchmusterung nach Bindern gegen EphA2. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Gezeigt sind die Daten der Induktions-Analyse (oben links), der Kontrolle gegen Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (oben rechts), der Sortierungen mit 500 nM EphA2 (unten links) und der Rücksortierung mit 500 nM EphA2 (unten rechts). Region R1 kennzeichnet die Hefezellen mit markiertem Myc-Epitop, Region R2 die Zellen, welche primär (direkt) oder sekundär (Bindung des His-Epitops des EphA2) durch Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> markiert wurden. In der Sortierung sowie Rücksortierung definiert die Region R2 außerdem den Bereich der aussortierten Zellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

Für die zweite Durchmusterungsrunde wurde wieder zunächst die Genexpression induziert (3.2.2). Vor der Durchmusterung wurde erneut eine Markierung des Myc-Epitops sowie zur Kontrolle mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> durchgeführt (3.8.1) und durchflusszytometrisch analysiert (3.8.2). Im Anschluss wurden Hefezellen wieder nacheinander mit 500 nM EphA2 sowie Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> ( $10 \mu\text{g/ml}$  PBS) inkubiert (3.8.1) und dann durchflusszytometrisch durchmustert (3.8.2). Die Daten sind in Abbildung 77 zusammengefasst.



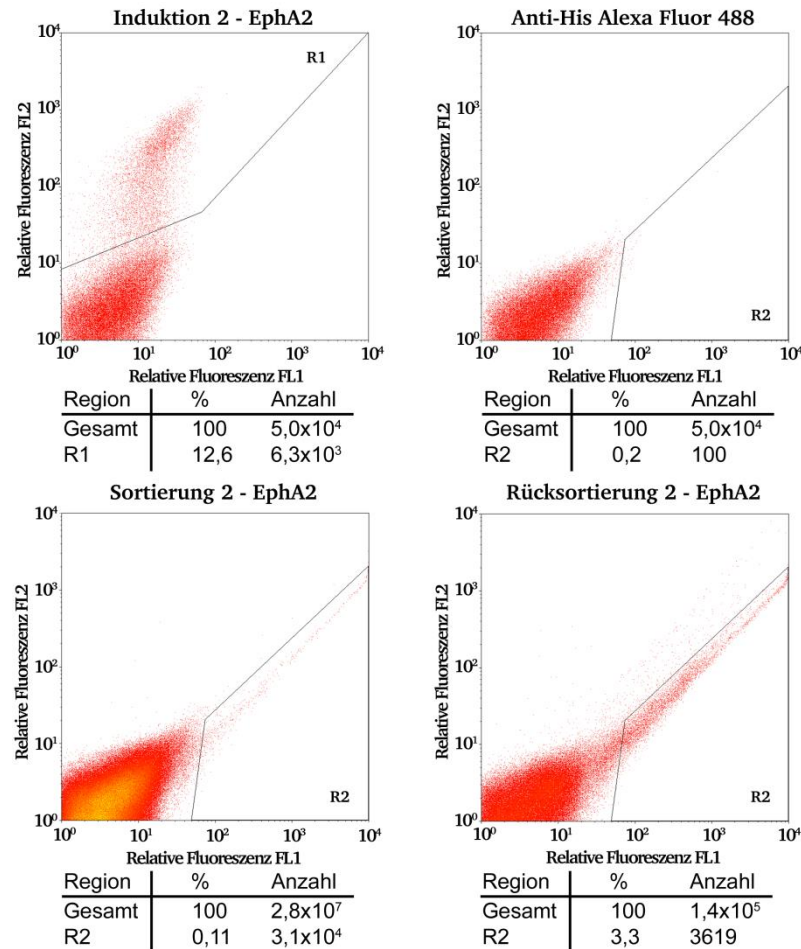


Abbildung 77: Daten der zweiten Runde der FACS gestützten Durchmusterung nach Bindern gegen EphA2. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Fluoreszenzen des FITC-Signals (FL1, X-Achse) und des PE-Signals (FL2, Y-Achse). Gezeigt sind die Daten der Induktions-Analyse (oben links), der Kontrolle gegen Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (oben rechts), der Sortierungen mit 500 nM EphA2 (unten links) und der Rücksortierung mit 500 nM EphA2 (unten rechts). Region R1 kennzeichnet die Hefezellen mit markiertem Myc-Epitop, Region R2 die Zellen, welche primär (direkt) oder sekundär (Bindung des His-Epitops des EphA2) durch Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> markiert wurden. In der Sortierung sowie Rücksortierung definiert die Region R2 außerdem den Bereich der aussortierten Zellen. Prozentangaben und Zellzahlen sind unterhalb des jeweiligen Dotplots angegeben.

Der Anteil an Myc-Epitop markierbaren Hefezellen hat sich von Runde eins auf Runde zwei auf nur noch 12 % verringert (Abbildung 77, oben links). In der Kontrolle mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> war keine Anreicherung an Bindern gegen den Fluoreszenzmarker zu erkennen (Abbildung 77, oben rechts). In der Sortierung (Abbildung 77, unten links) zeigte sich dasselbe Fluoreszenzmuster wie in der Rücksortierung der ersten Runde (vergleiche Abbildung 76). Der Anteil an EphA2 bindenden Hefezellen konnte prozentual von Runde eins auf Runde zwei jedoch nicht wesentlich gesteigert werden ( $R2 = 0,11\%$ ). Wie in der Rücksortierung (Abbildung 77, unten rechts) erkennbar, fand jedoch eine leichte Anreicherung dieser Population durch Sortierung zwei statt ( $R2 = 3,3\%$ ). Die aussortierten Hefezellen wurden im Anschluss vollständig auf SD(-Trp)-Agar (2.9.2) ausgebracht und für etwa 72 Std bei 30 °C inkubiert. Für Analysen von Einzelklonen, wurden zehn Einzelklone kultiviert sowie die Genex-



pression induziert (3.2.2). Parallel dazu wurde genauso mit zehn Einzelklonen aus der Anreicherung aus Runde eins (vergleiche Abbildung 76) verfahren, da der Anteil an Myc-Epitop markierbaren Hefezellen schon durch die erste Sortierung stark reduziert wurde. Die insgesamt zwanzig Einzelklone wurden anschließend für eine Markierung des Myc-Epitops eingesetzt (3.8.1) und durchflusszytometrisch analysiert (3.8.4; siehe Abbildung 78).

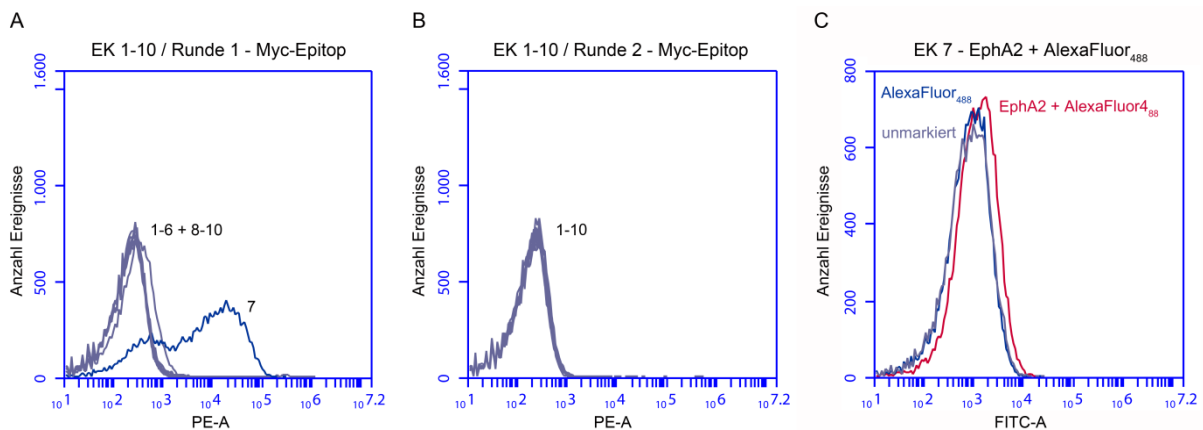


Abbildung 78: Daten der Analysen der Einzelklone 1-10 aus den Runden eins und zwei der Durchmusterung gegen EphA2. Dargestellt sind Histogramme des Signals des Fluoreszenzkanals FL2 (PE) bzw. FL1 (FITC). Abbildung A und B zeigt die Myc-Epitop Markierung der Einzelklone der Runden 1 und 2. In Abbildung C ist die weitere Analyse des Einzelklons sieben aus Runde 1 (Abbildung A) dargestellt. Es wurden nicht markierte Hefezellen (unmarkiert), die Kontrolle mit ausschließlich Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (AlexaFluor<sub>488</sub>) und die Antigenbindung mit EphA2 und Penta-his-AlexaFluor<sub>488</sub> analysiert. Gemessen wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Ereignisse.

Die Analyse der Myc-Epitop Markierung in Abbildung 78 zeigt, dass lediglich ein Einzelklon (EK7 / Runde 1) ein Fluoreszenzsignal aufwies. Alle anderen Einzelklone waren nicht markierbar. Einzelklon 7 wurde im Anschluss mit 500 nM EphA2 und Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> (10  $\mu$ g / ml) markiert und analysiert (3.8.1, 3.8.4), zeigte aber kein entsprechendes Fluoreszenzsignal (Abbildung 78 C). Aufgrund der Datenlage wurde das Projekt vorerst nicht weiter bearbeitet.

#### 4.2.5.7 Diskussion der Ergebnisse

Die Durchmusterung nach EphA2 bindenden VHH-Antikörpern war ebenfalls Teil der Immunisierung des Lamas zur Generierung von *in vivo* affinitätsgereiften VHH-Antikörpern. Das Antigen EphA2 wurde auch zu Beginn des Projekts mit in die immunochemische Analyse (4.2.1.1) aufgenommen und Prä- sowie Post-Serum auf ihre antigenspezifische Bindeeigenschaften getestet. Die Analyse zeigte für EphA2 einen leichten Signalanstieg im Postserum gegenüber dem Präserum (Abbildung 59 B).

In der durchflusszytometrischen Durchmusterung wurden zwei Runden durchgeführt (Abbildung 76 und Abbildung 77). Aufgrund des nur leichten Anstieges der Signalstärke in der immunochemischen Analyse (Abbildung 59 B) wurde hier wieder mit 500 nM Antigen ge-

arbeitet und von einer Durchmusterung mit 1-100 nM wie in der Durchmusterung gegen huEGFR (vergleiche 4.2.5.3) abgesehen. In der ersten Runde der Sortierung (Abbildung 76, Sortierung 1) war ein nur sehr geringer Anteil an markierten Hefezellen in der Region R2 (0,1 %) zu beobachten, jedoch zeichnete sich dieser in der Rücksortierung (Abbildung 76, Rücksortierung 1) bereits als markante Population ab ( $R2=11,5\%$ ). Eine starke Anreicherung konnte in Runde 2 (Abbildung 77, Sortierung 2) nicht beobachtet werden, jedoch trennte sich die aussortierte Population in Region R2 aus Runde eins deutlich ab. In der darauffolgenden Rücksortierung (Abbildung 77, Rücksortierung 2) war eine weitere Abtrennung dieser Population möglich. Die Negativkontrollen mit Penta-His-AlexaFluor<sub>488</sub> zeigten in beiden Runden keine nennenswerten Populationen an markierten Zellen (Abbildung 76 und Abbildung 77, Anti-His AlexaFluor<sub>488</sub>). Die Induktionskontrolle zeigte jedoch einen deutlichen Abfall an positiv markierten Ereignissen in der Region R1 (Abbildung 76 und Abbildung 77, Induktion 1 bzw. 2). Die Abnahme der Myc-Epitop markierbaren Zellen durch die Durchmusterung bestätigte sich auch anschließend bei der Analyse der Einzelklone. Hier konnte das Myc-Epitop nur bei einem aus zwanzig Klonen (Abbildung 78; Klon 7 Runde 1) erfolgreich markiert werden (Abbildung 78). Für eine Bindungsanalyse mit EphA2 wurde aufgrund der Myc-Kontrolle nur Einzelklon 7 (Abbildung 78 A) aus Runde eins verwendet. Dieser zeigte jedoch keine Bindungseigenschaften gegenüber EphA2 (Abbildung 78 C). An dieser Stelle wurde wegen des fehlenden Signals bei den Myc-Epitop Markierungen zunächst vermutet, dass keine Oberflächenpräsentation mehr induziert werden konnte. Die Analyse von Einzelklonen sowie weitere Durchmusterungen wurden deshalb abgebrochen.

Durch parallel zu dieser Durchmusterung verlaufene Analysen von angereicherten Subbibliotheken sowie Einzelklonen anderer Projekte (4.1.9.2 und 4.1.9.9) konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Myc-Epitop, bedingt durch ein Stopcodon (Abbildung 53) oder Sequenzfehler im Bereich der CDR-3 oder des *framework* 4 (Abbildung 26), nicht translatiert, eine Antigenbindung jedoch nachgewiesen werden kann (Abbildung 39 und Abbildung 51). Eine Markierung des N-terminalen HA-Epitops hätte hier Aufschluss über die Oberflächenpräsentation geben können, auch wenn diese Markierung keinen Beweis für die Existenz des daran anschließenden, C-terminalen VHHs geben kann (vergleiche Abbildung 28 und Abbildung 36). Eine technische Möglichkeit durch Verwendung eines zweiten Lasers zur parallelen Markierung mit Antigen EphA2 und des Myc-Epitops bei der Durchmusterung würde eine Anreicherung solcher fehlerhaften Sequenzen verhindern.

---

#### 4.2.5.8 Isolierung von VHH-Einzelklonen gegen mEGFR

---

Als letztes Projekt soll hier die Durchmusterung der Bibliothek nach Bindemolekülen gegen den murinen EGF-Rezeptor (mEGFR) vorgestellt werden. Das Projekt konnte nicht weiter als bis zum Anschluss der zweiten Durchmusterung bearbeitet werden, da es erst in den letzten Wochen der Doktorarbeit begonnen wurde. Da der mEGFR jedoch bereits in den einleitenden

Experimenten eingesetzt (vergleiche 4.2.1.1) und die Durchmusterungen, anders als in den Projekten zuvor, am FACS Influx (3.8.3) der Fa. BD durchgeführt wurden, wird im folgenden Abschnitt der bisherige Stand des Projekts zusammengefasst. Das Protein wurde ebenfalls, wie auch schon der humane EGF-Rezeptor (vergleiche 4.2.5.1), von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) biotinyliert zur Verfügung gestellt.

Für die Durchmusterung wurde erneut ein Aliquot der kompletten Bibliothek aufgetaut (Kryokultur;  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und in SD(-Trp)-Medium (2.9.2) kultiviert sowie anschließend die Genexpression induziert (3.2.2). Vor der Durchmusterung wurde zunächst die Zugänglichkeit des Myc-Epitops analysiert (3.8.1, 3.8.4; siehe Abbildung 79).

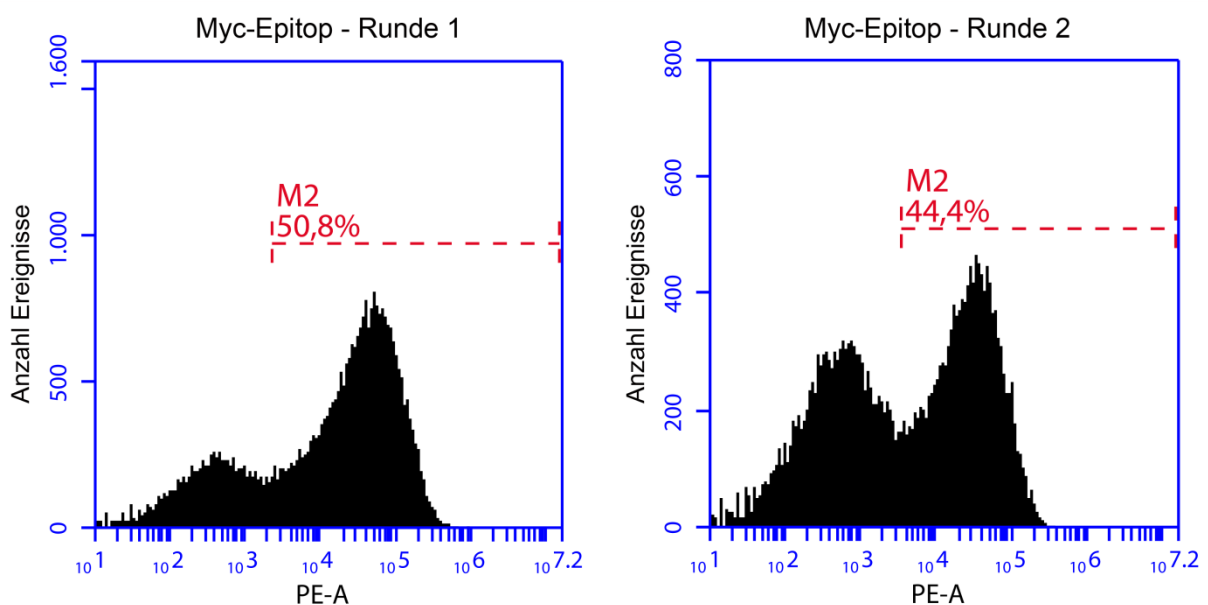


Abbildung 79: Daten der Myc-Epitop Markierung aus Runde eins und zwei der Durchmusterung gegen mEGFR. Dargestellt sind Histogramme des Fluoreszenzsignals des Fluoreszenzkanals FL2 (PE). Die Region M2 kennzeichnet die Population der am Myc-Epitop markierten Hefezellen (50,8 % bzw. 44,4 %).

In beiden Runden der Durchmusterung gegen mEGFR zeigten etwa 50 % bzw. 45 % der Hefezellen ein Fluoreszenzsignal durch Markierung des Myc-Epitops (Abbildung 79). Vor den Durchmusterungen eins und zwei wurden zusätzliche Kontrollmarkierungen nur mit dem Fluoreszenzmarker SAPE ( $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  PBS) durchgeführt, um den Anteil an SAPE bindenden Hefezellen zu kontrollieren und eine Anreicherung solcher Binder zu vermeiden. Im Anschluss daran wurden jeweils die Sortierungen eins und zwei durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit  $500\text{ }\mu\text{M}$  mEGFR und anschließend mit SAPE ( $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  PBS) inkubiert (3.8.1). Die SAPE-Kontrollen sowie die Durchmusterung wurde mit dem FACS Influx ausgeführt (3.8.3). Die Daten sind in Abbildung 80 zusammengefasst.

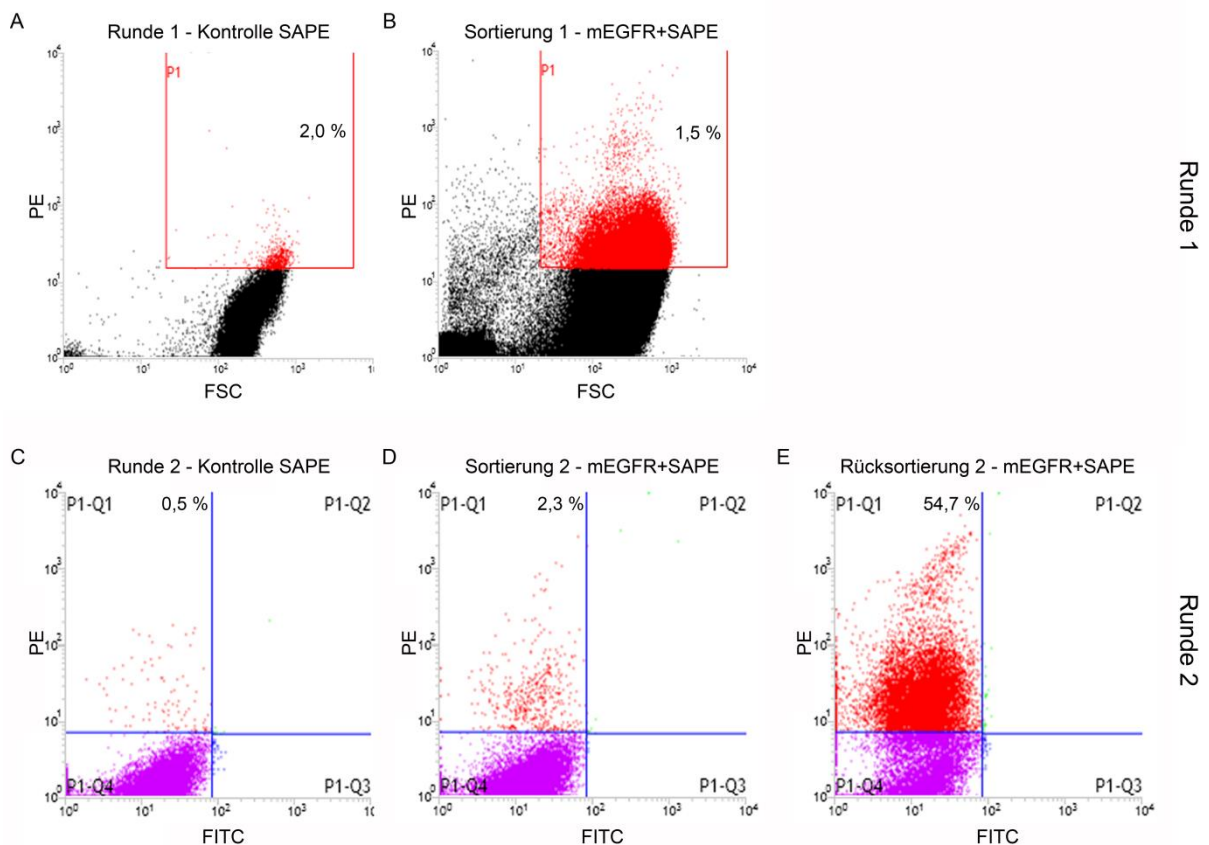


Abbildung 80: Daten der ersten und zweiten Runde der FACS gestützten Durchmusterung nach Bindern gegen mEGFR. Dargestellt sind zweidimensionale Dotplots mit logarithmisch aufgetragenen, relativen Signalen (FSC, PE oder FITC). Gezeigt sind die Daten der Kontrollen gegen SAPE (Spalte eins), der Sortierungen der Runde eins und zwei mit 500 nM mEGFR (Spalte zwei) sowie der Rücksortierung der Runde zwei (Spalte drei). Region P1 bzw. P1-Q1 definiert den Bereich der aussortierten Zellen. Prozentangaben sind innerhalb der jeweiligen Region im Dotplot angegeben.

Die Kontrollen mit SAPE (Abbildung 80, Spalte 1) zeigen in beiden Runden vereinzelte Ereignisse in der Region P1 (2,0 %), bzw. P1-Q1 (0,5 %). In der ersten Sortierung lag der prozentuale Anteil an fluoreszenzmarkierten Ereignissen mit 1,5 % noch im selben Bereich wie bei der SAPE-Kontrolle (Abbildung 80, Reihe 1). Die SAPE-Kontrolle in Runde 2 zeigte ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 80, Reihe 2). Lediglich 0,5 % der Ereignisse wurden in der entsprechenden Region P1-Q1 gemessen. Durch die Markierung mit mEGFR und SAPE konnten bei der anschließenden Durchmusterung 2,3 % der Hefezellen aussortiert werden (Abbildung 80, Reihe 2). Die Anreicherung lag in der darauffolgenden Rücksortierung bereits bei 55 %.

#### 4.2.5.9 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Analyse des Prä- und Post-Serums (Abbildung 59) konnte bereits eine gesteigerte Bindung des mEGFR durch das Postserum gegenüber dem Präserum gezeigt werden. Da das mEGFR bereits biotinyliert zur Verfügung stand, konnte das Antigen mit SAPE markiert wer-

den. Durchmustert wurde hier erstmalig mit dem INFLUX Sortiergerät der Fa. BD (Tabelle 6). Diese Durchmusterung wurde in den letzten Wochen der Doktorarbeit durchgeführt und diente dem Versuch, potentielle Binder durch Anreicherung nachzuweisen. Eine Analyse von Einzelklonen konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

In den beiden durchgeführten Runden der Durchmusterung gegen mEGFR konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung an Bindern gegen das Antigen potentiell möglich ist (Abbildung 80). Vergleicht man die Sortierungen der Runden eins und zwei (Abbildung 80 B und D) so zeigt sich eine leichte Anreicherung an markierten Hefezellen in den Regionen P1 bzw. P1-Q1 von 1,5 % auf 2,3 %, wobei die Region R1 in Runde eins sehr großzügig gewählt wurde. Das Potential der Anreicherung zeigt sich ebenfalls in der Rücksortierung der Runde zwei (Abbildung 80 E). Hier zeigt sich, dass der Anteil positiv markierter Hefezellen von 2,3 % auf 54,7 % gesteigert werden konnte. In der Kontrolle mit SAPE (Abbildung 80 C) ist eine kleine Population (0,5 %) an markierten Zellen in der Region P1-Q1 zu sehen, was auf einen geringen Anteil an möglichen SAPE bindenden Hefezellen hindeutet. Der Anteil an Hefezellen, die durch mEGFR markiert werden können, ist jedoch zu diesem Zeitpunkt mit 2,3 % bereits fünffach höher. Gemessen an den Resultaten der anderen beiden Durchmusterungen mit dieser VHH-Bibliothek (vergleiche 4.2.5.1 und 4.2.5.6) und den Daten zur Analyse der Seren (Abbildung 59) sowie zur Anreicherung im FACS (Abbildung 80), könnten Binder gegen mEGFR aus dieser Bibliothek mit hoher Wahrscheinlichkeit isoliert werden.

---

#### 4.2.6 Zusammenfassung der löslichen Expression von VHH-Antikörpern in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

---

In den in dieser Doktorarbeit durchgeführten Durchmusterungen (vergleiche 4.1.9 und 4.2.5) wurden Bindungsanalysen zur Bestimmung der  $K_D$  in der Regel nur durch Titrations auf Hefen durchgeführt. Lediglich bei der Durchmusterung der naiven Bibliothek nach Bindern gegen P-Cadherin konnten VHH-Antikörper eines isolierten Einzelklons löslich produziert und im *Octet RED System* vermessen werden (4.1.9.9). Grund hierfür war ein fehlendes optimiertes Expressionssystem nutzbar in *E. coli* oder *S. cerevisiae*, welches eine generelle lösliche Produktion von VHH-Antikörpern ermöglicht. Mit dem Plasmid-Konstrukt pEX (2.5.3) und den verwendeten Produktionsparametern waren in anderen Expressionsansätzen keine quantitativen Ausbeuten mit ausreichender Nachweisbarkeit in anschließenden gelelektrophoretischen oder immunchemischen Analysen möglich (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte daran gearbeitet werden, ein allgemein nutzbares Expressionssystem für die Verwendung in *E. coli* und in *S. cerevisiae* zu etablieren, mit dem eine generelle Expression von VHH-Antikörpern möglich ist. Dieses sollte ausreichende Flexibilität besitzen und mindestens zwei Vektoren für unterschiedliche Expressionsprodukte beinhalten. Darüber hinaus sollten Expressionen als Fusion mit Detektor-Enzymen und FC-Fragmenten ermöglicht werden. Diese Projekte wurden in Zusammenarbeit mit Karina Winterling im Rahmen ihrer Diplomarbeit bearbeitet und sollen im Folgenden nur kurz zusammengefasst werden.

#### 4.2.6.1 Verwendung des Vektorkonstrukts pEX in *Escherichia coli*

Für die Etablierung wurden die Vektor-Konstrukte pEX (2.5.3), pMX (siehe Diplomarbeit Karina Winterling <sup>[213]</sup>), pTET (2.5.4) sowie pYD (2.5.5) eingesetzt. Letzteres diente zur Expression in *S. cerevisiae* und wurde von Laura Riehl (Merck KGaA, Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Zunächst sollte der bereits verwendete Vektor pEX genutzt werden, um mit dem integrierten VHH-Gen des Einzelklons 4 aus der Durchmusterung gegen P-Cadherin (4.1.9.9) die Expressionsbedingungen zu optimieren. Hierfür wurden zunächst zwei verschiedene *E. coli*-Stämme (BMH7118 und ER2738; 2.1) mit dem Plasmid transformiert und anschließend unterschiedliche Expressionsbedingungen (Temperatur und Dauer) im 50 ml Maßstab getestet sowie nach Reinigung über eine IMAC (3.5.4) gelelektrophoretisch analysiert (3.5.2, Abbildung 81).

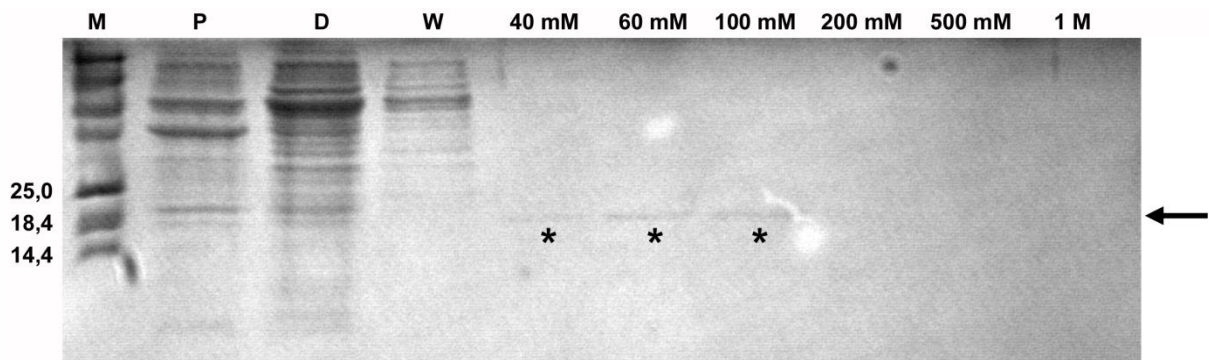


Abbildung 81: Gelelektrophoretische Analyse der gesammelten Fraktionen nach Reinigung über IMAC. Nach Expression des P-Cadherin-VHHs in BMH7118 bei 25°C für 24 Std wurden die Zellen im *Cell Disruptor* aufgeschlossen. Aufgetragen wurden das Zellpellet (P), der Durchfluss des Gesamtüberstandes (D), der Waschschritt mit PBS sowie die Elutionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Imidazol (40mM-1M). Der Pfeil markiert die für VHHs erwartete Banden-Höhe bei etwa 16 kDa. Entsprechende VHH-Banden bei 40, 60 und 100 mM sind zusätzlich mit einem Stern gekennzeichnet. Wichtige Banden des Markers (M, 2.3.2.1) sind an der linken Seite beschriftet.

Nach Ermittlung geeigneter Bedingungen (BMH7118, 25 °C und 24 Std; Abbildung 81) wurde die Expression im 1 L Maßstab wiederholt und anstelle eines Ganzzellaufschlusses eine Periplasmapreparation (3.1.6) durchgeführt und optimiert, um nur ins Periplasma sekretierte und vollständig gefaltete VHHs zu isolieren. Die Analyse wurde nach einer IMAC an der FPLC (3.5.5) erneut mittels SDS-Gelelektrophorese (3.5.2) sowie einem anschließenden Western-Blot (3.5.2.4, Abbildung 82) analysiert.



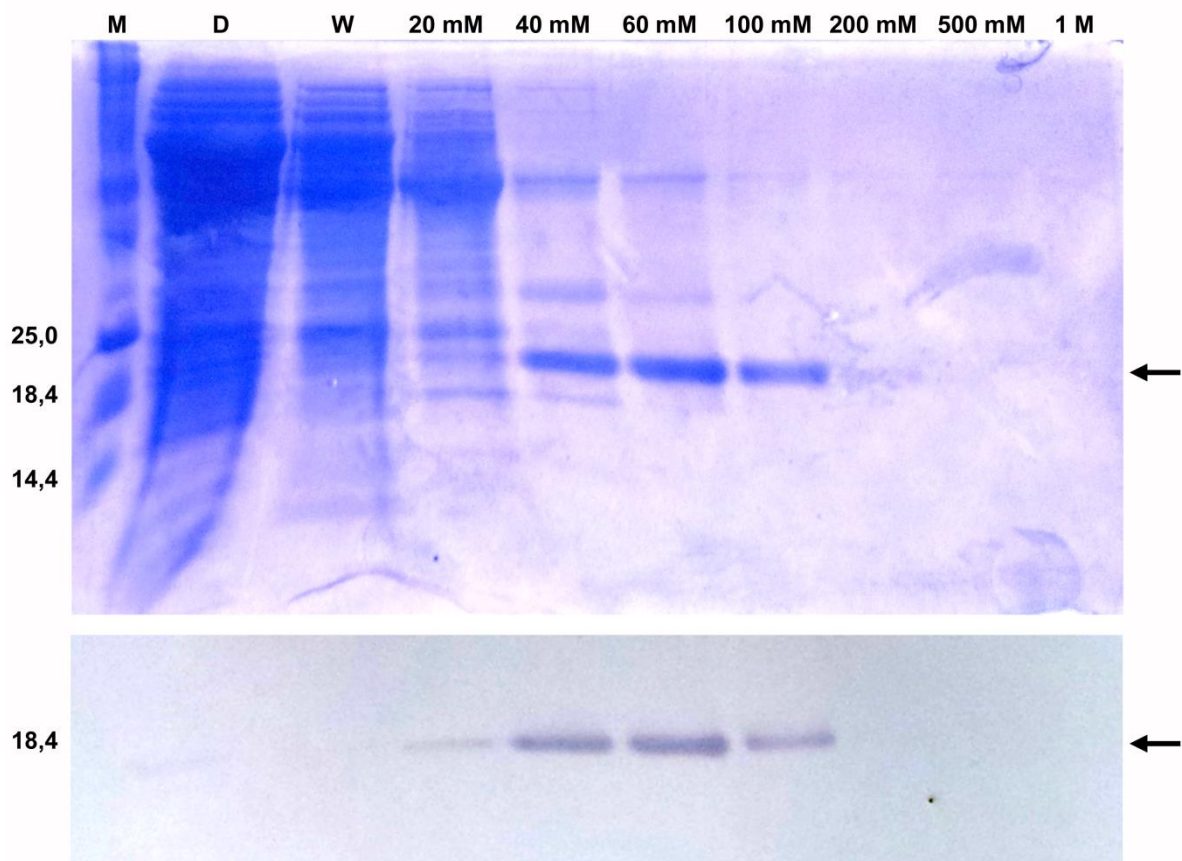


Abbildung 82: Analyse der Periplasmapräparation mittels Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot der gesammelten Fraktionen nach Reinigung über IMAC. Die gesammelten Fraktionen (D=Durchfluss, W=Waschschritt, 20mM-1M=Imidazol-Elutionen) der IMAC wurden analysiert. Die Pfeile markieren die für VHHs erwartete Banden-Höhe bei etwa 16 kDa. Wichtige Banden des Markers (M, 2.3.2.1) sind an der linken Seite beschriftet.

Durch Gelelektrophorese (3.5.2) und Western Blot (3.5.2.4, Anti-Myc-IgG und Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase) konnten für die Produktion im 1 L Maßstab eine Expression des VHH-Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 82). Die Fraktion 100 mM wurde aufgrund ihrer geringeren Verunreinigung für eine Konzentrationsbestimmung genutzt und der Proteingehalt auf 22,5  $\mu$ g bestimmt.

#### 4.2.6.2 Verwendung der Vektorkonstrukte pMX und pTET in *Escherichia coli*

Neben der Expression des VHH-Antikörpers als solitäres Fragment, sollte ebenfalls eine Produktion als Fusionsprotein für eine verbesserte Stabilität und Ausbeute untersucht werden. Hierfür wurden die Vektor-Konstrukte pMX (siehe Diplomarbeit Karina Winterling <sup>[213]</sup>) und pTET (2.5.4) genutzt, die eine Fusion mit dem Maltosebindeprotein bzw. der Alkalischen Phosphatase ermöglichen. Letztere Fusion sollte vor allem anschließend in ELISA-Experimenten für einen direkten immunchemischen Nachweis (3.5.8) zum Einsatz kommen.



Für die Klonierung und anschließende Expression wurde für die Maltosebindeprotein-Fusion das VHH des Einzelklons vier aus der Durchmusterung gegen huEGFR (4.2.5.4), für die Fusion mit Alkalischer Phosphatase wieder der Anti-P-Cadherin VHH-Antikörper des Einzelklons vier verwendet (4.1.9.8). Für beide Konstrukte wurden erneut verschiedene Expressionsbedingungen getestet und die Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (3.5.2) und Western-Blot (3.5.2.4) durchgeführt. Die Maltosebindeprotein-VHH-Fusion konnte gelelektrophoretisch und immunchemisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch kam es bei der Reinigung durch IMAC zu deutlichen Verunreinigungen, die nicht abgetrennt werden konnten. Bei der Produktion als Fusion mit Alkalischer Phosphatase konnte keine eindeutige Bande auf einem der SDS-Gele identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Expressionssysteme wurden aufgrund dessen in der gegenwärtigen Form nicht als geeignete Methode zur Proteinproduktion eingestuft.

---

#### 4.2.6.3 Verwendung des Vektorkonstrukts pYD in *Saccharomyces cerevisiae*

---

Als Alternative zur Proteinexpression in *E. coli* sollte ein Expressionssystem in Hefen etabliert werden. Die Idee dabei war, einen Wechsel des Organismus zu vermeiden und somit gleiche Voraussetzungen bei der Expression des Antikörpers (*codon usage*, Glykosylierung, posttranslationale Prozessierung) zu schaffen. Des Weiteren sollte diese Art der Expression genutzt werden, um die VHH-Antikörper als Fusion mit einem humanen FC-Antikörperfragment zu exprimieren. Auf diese Weise exprimierte VHH-Antikörper würden als Dimere vorliegen und dadurch eine erhöhte Affinität gegenüber ihrem Antigen bedingt durch Aviditätseffekte erhalten<sup>[214], [215]</sup>. Außerdem würden diese Fusionsproteine an Stabilität in Lösung gewinnen<sup>[216]</sup>. Für spätere potentielle klinische und biochemische Anwendungen wäre eine FC-Fusion außerdem in ihrer dadurch vermittelten Funktionalität<sup>[217], [218]</sup> von Bedeutung.

Als Vektor-Konstrukt wurde das Plasmid pYD (2.5.5), das über eine app8-Signalsequenz<sup>[177]</sup>, sowie ein Gen für ein humanes FC-Fragment, das auch im Antikörper Erbitux (Tabelle 4) Verwendung findet. Für die Etablierung dieses Expressionssystems wurde ein spezieller Hefestamm EBY100 PDI<sup>[177]</sup> eingesetzt, der über ein ins Genom integriertes Gen für das Chaperon PDI besitzt, das für eine optimierte Faltung und dadurch erhöhte Ausbeute von exprimierten Antikörperfragmenten beschrieben wurde<sup>[219]</sup>. Als VHH-Antikörper wurden zum einen ein zur Verfügung gestelltes VHH-Gen VHH D12, das von Laura Riehl zur Verfügung gestellt wurde, und zum anderen erneut die Sequenz des Anti-P-Cadherin VHHs (vergleiche 4.1.9.8) verwendet.

Zunächst wurden Expressionen mit dem VHH D12 durchgeführt. Nach anschließender Dialyse des Überstandes erfolgte die Reinigung der VHH-FC-Fusion mittels Protein A-Säule (3.5.5) sowie PD10-Säule für den Wechsel des Puffers. Die Analyse der Expression wurde durch SDS-Gelelektrophorese (3.5.2) verifiziert (Abbildung 83).

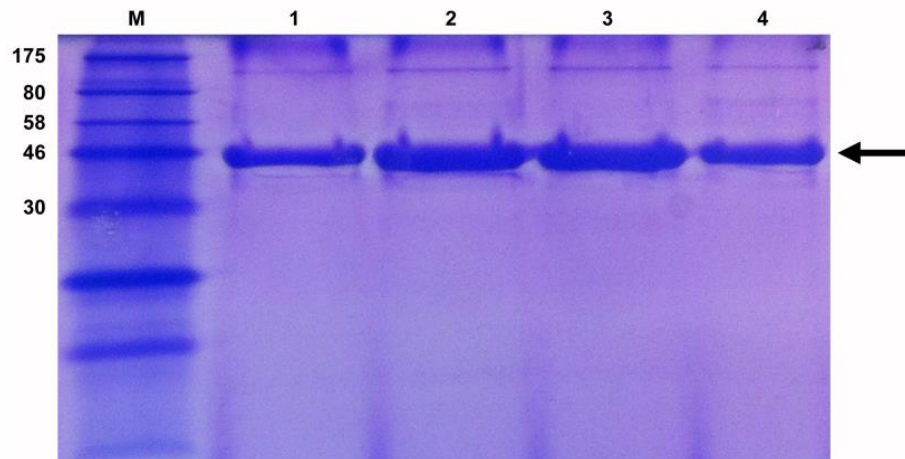


Abbildung 83: Gelelektrophoretische Analyse der VHHD12-Fc-Produktion nach Reinigung über eine Protein A- sowie PD10-Säule. Aufgetragen wurden die vier Fraktionen (1-4) nach PD10-Säulenreinigung. Der Pfeil markiert die Bande für die VHH-Fc-Fusion bei etwa 40 kDa. Wichtige Banden des Markers (M, 2.3.2.1) sind an der linken Seite beschriftet.

Das SDS-Gel in Abbildung 83 zeigt in allen vier Fraktionen der Reinigung mittels PD10-Säule eine markante Bande knapp unter der 46 kDa Referenzbande des Markers. Diese Banden entsprechen der VHH-FC-Fusion, die ein Molekulargewicht von 39,6 kDa besitzt. Für einen immunchemischen Nachweis wurde eine weitere Gelelektrophorese durchgeführt und verschiedene Proben (aufgeschlossenes Pellet, Zellüberstand, Überstand nach Dialyse und Durchfluss der Säule) analysiert (Abbildung 84). Die Proben wurden zuvor mittels Methanol-Chloroform-Fällung gereinigt. Der immunchemische Nachweis erfolgte mit Anti-Human-IgG und Anti-Hase-IgG-Merrettich Peroxidase.

Die Analyse der VHHD12-FC-Produktion in Abbildung 84 zeigt erneut die Bande in Höhe von etwa 40 kDa in der Spur des über die PD10-Säule gereinigten VHH-FC-Antikörpers (Abbildung 84 A, VHH). In allen anderen Spuren sind ebenfalls schwache Banden in entsprechender Höhe zu sehen. Der anschließend durchgeführte Western Blot (Abbildung 84, B) konnte nur undeutlich entwickelt werden und zeigt deshalb nur eine schwache Bande in der Spur der gereinigten VHH-Fc-Fusion (Abbildung 84 B, VHH). Die nur schlecht erkennbare Bande wurde deshalb anschließend grafisch zur Verdeutlichung hervorgehoben (Abbildung 84 C). In gleicher Weise wurde die Expression der VHH-FC-Fusion mit dem Anti-P-Cadherin-VHH durchgeführt. Nach der Reinigung über eine PD10-Säule konnten jedoch keine entsprechenden Banden im SDS-Gel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein Produkt konnte auch nach mehrfacher Wiederholung von Expression, Reinigung und Analyse nicht generiert werden.

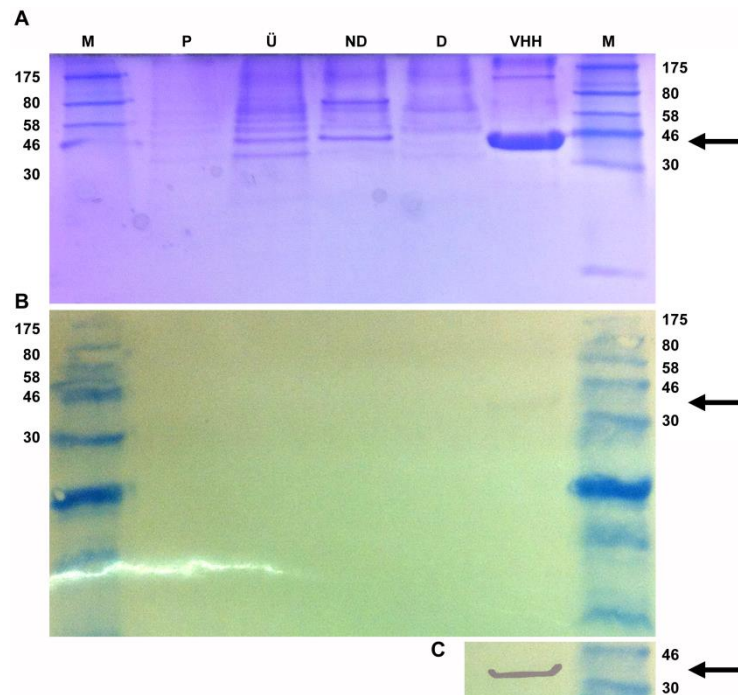


Abbildung 84: Analyse mittels Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot der gesammelten Fraktionen nach Reinigung über Protein A- sowie PD10-Säule. Analysiert wurden folgende Proben: P=Zellpellet, Ü=Zellüberstand, ND=Nach Dialyse, D=Säulen-Durchfluss, VHH=VHHD12-FC nach PD10-Säule. Die Pfeile markieren die für die VHH-Fc-Fusion erwartete Banden-Höhe bei etwa 40 kDa. Wichtige Banden des Markers (M, 2.3.2.3) sind an der linken Seite beschriftet.

#### 4.2.6.4 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeiten war es, geeignete Expressionssysteme für die Expression von VHH-Antikörpern zu etablieren. Hierfür wurden *E. coli* sowie *S. cerevisiae* als Expressionsorganismen gewählt. In *E. coli* sollten VHH-Antikörper solitär (pEX) und als Fusion mit Maltosebindeprotein (pMX) und Alkalische Phosphatase (pTET) exprimiert werden. Für das Expressionssystem pEX konnten geeignete Bedingungen für eine Produktion gefunden werden (4.2.6.1). Die exprimierten VHH-Antikörper konnten dabei gelelektrophoretisch und immunchemisch nachgewiesen werden (Abbildung 82). Der Proteingehalt der 100 mM Fraktion wurde photometrisch auf 22,5  $\mu\text{g}$  bestimmt. Für den Gesamtansatz kann anhand der Bandenstärken eine Ausbeute in der Größenordnung 100  $\mu\text{g/l}$  angenommen werden. Die dafür verwendeten Reinigungsmethoden erzielten einen Reinheitsgrad, der ausreichend für erste Analysen war, jedoch für Bindungsstudien optimiert werden müsste.

Als Maltosebindeprotein-Fusion konnte ein VHH-Antikörper ebenfalls exprimiert werden (Daten nicht gezeigt), jedoch nicht im ausreichenden Maße gereinigt werden (IMAC). Hierfür müsste eine Säule mit Amylose-Matrix eingesetzt werden, an die das Maltosebindeprotein bindet <sup>[220]</sup>. Die Expression als Fusion an Alkalische Phosphatase dagegen konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Keiner der elektrophoretischen Analysen erbrachte eine eindeutige Bande in entsprechender Höhe. Hier wäre eine Expressionsanalyse

mit verschiedenen VHH-Genen zielführend, da auch bei der Verwendung anderer Expressionssysteme nicht alle untersuchten VHHs exprimiert werden konnten (vergleiche 4.2.6.3).

Die Expression der VHH-FC-Fusion mit dem Vektor pYD in *S. cerevisiae* war erfolgreich für VHH-D12. Hier konnten deutliche Banden im SDS-Gel detektiert werden (Abbildung 83 und Abbildung 84). Der immunchemische Nachweis war bedingt durch die Durchführung nur schlecht erkennbar, jedoch vorhanden (Abbildung 84). Für die Expression mit dem Anti-P-Cadherin-VHH konnte jedoch kein Produkt detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bislang wurde keine eindeutige Erklärung gefunden. Mittels verschiedener *E. coli*-Expressionssystemen war eine Produktion möglich (4.1.9.9, 4.2.6.1 und 4.2.6.2). Auch eine Expression in Hefen als Aga2-Fusion und anschließender Oberflächenpräsentation war erfolgreich (4.1.9.8). Ein Grund für das Ausbleiben einer VHH-Sekretion mit dem vorhandenen Expressionssystem in *S. cerevisiae* könnte der verwendete Fc-Teil sein, der vermutlich eine generell eher geringe Ausbeute erzielen sollte<sup>[70]</sup>. Die Ausbeuten bei der Expression verschiedener VHHs schwanken, nicht zuletzt aufgrund der vorhandenen *codon usage*. Eine weitere Fehlerquelle könnte eine nicht vorhandene Kompatibilität des app8-Signalpeptids mit der VHH-Sequenz sein. Hier würde sich anbieten, einen Austausch gegen eine native Signalsequenz vorzunehmen und erneute Expressionsanalysen durchzuführen. Auch könnte ein Austausch des Replikationsursprungs höhere Ausbeuten bringen. Der hier verwendete CEN6/ARS4 Replikationsursprung führt lediglich zu einer geringen Anzahl an Kopien in den Hefezellen<sup>[159]</sup>. Die Verwendung eines 2  $\mu$  Replikationsursprungs dagegen veranlasst die Hefezelle zur Replikation des Plasmids in hoher Kopienzahl<sup>[159]</sup> und würde so die Transkription der mRNA steigern.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Generierung von VHH-Varianten-Bibliotheken in *phage*- und *yeast Display* Plattformen sowie die anschließende Durchmusterung zweier erzeugter Hefe-Bibliotheken. Der Unterschied dieser beiden Hefe-Bibliotheken lag im genetischen Ausgangsmaterial, das zum einen aus einer Herde (12 Tiere) nicht immunisierter Tiere, zum anderen aus einem zuvor immunisierten Individuum stammte. Aus diesen beiden Varianten-Bibliotheken, die eine Größe von  $4,8 \times 10^8$  (naives Repertoire), bzw.  $2,8 \times 10^8$  (affinitätsgereiftes Repertoire) Transformanden hatten, konnten eine Reihe VHH-Antikörper gegen verschiedene Antigene isoliert werden. Die gemessenen Affinitäten der VHH-Antikörper, welche aus dem naiven Repertoire isoliert wurden, waren erwartungsgemäß aufgrund fehlender Affinitätsreifung niedrig und bestätigten publizierte Angaben <sup>[100], [108]–[111]</sup>. Im Vergleich konnten VHH-Antikörper aus der affinitätsgereiften Bibliothek aufgrund höherer Auftrittshäufigkeit schneller und mit höherer Wahrscheinlichkeit, als VHH-Antikörper aus der naiven Bibliothek isoliert werden. Außerdem konnte für VHH-Antikörper, welche aus der affinitätsgereiften Bibliothek stammten, im Durchflusszytometer eine leicht erhöhte Antigen-Affinität gemessen werden. Die Immunisierungsstrategie, bei der gleichzeitig mehrerer Antigene für die Immunisierung eines Tieres eingesetzt wurden, erwies sich als effektiv. Gegen alle anschließend eingesetzten Antigene konnten spezifische VHH-präsentierende Hefezellen bereits in nur einer Durchmusterungsrunde angereichert werden. Die anfangs niedrigen Ausbeuten bei der Produktion von VHH-Antikörpern in *E. coli* wurden auf ein ausreichendes Niveau für anschließende Bindungsstudien gesteigert.

Für die Isolierung von VHH-Antikörpern aus beiden Bibliotheken (naive und affinitätsgereifte Bibliothek) sollte zukünftig die Verwendung eines FACS mit zwei Lasern zum Einsatz kommen, um zeitgleich die Effizienz der Oberflächenexpression und die Antigenbindung ohne spektrale Überschneidungen analysieren zu können. Um VHH-Antikörper mit nanomolaren Affinitäten isolieren zu können, bedarf es der Reduktion der Antigenkonzentration in den Durchmusterungsrunden zwei und drei. Die daran anschließende Analyse von Einzelklonen sollte in deutlich höherem Durchsatz erfolgen, um die Isolierung der VHH-Antikörper mit den besten Eigenschaften aus dem angereicherten Repertoire zu gewährleisten. Für die Verbesserung von weiteren Eigenschaften wie Stabilität, könnten suboptimal eingestellte Parameter (z. B. pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentrationen, etc.) bei der Antigenmarkierung zielführend sein.

Die während dieser Arbeit isolierten VHH-Antikörper können in nachfolgenden *in vitro* Optimierungen als Matrizen zur Generierung von Antikörpern mit verbesserter Eigenschaften dienen, obgleich bereits erfolgreiche Studien mit VHH-Antikörpern, die vergleichbare Affinitäten aufwiesen, publiziert wurden (Tabelle 1). Zur weiteren Verbesserung der Produktionsausbeute von VHH-Antikörpern wären genetisch optimierte Hefe-Stämme aussichtsreich. Hierfür kämen beispielsweise genomisch integrierte Oxidoreduktasen (z. B. PDI) oder verschiedene

Chaperone in Frage <sup>[177], [219]</sup>. Auch könnte ein speziell für die Sekretion von VHH-Fragmenten optimiertes Signalpeptid hergestellt werden.

Arbeiten zur Generierung einer zukunftsorientierten Oligomerisierung von VHH-Antikörpern zur Steigerung der Affinität wurden bereits initialisiert. Diese Strategie zur Verfolgung einer solchen mono- oder bispezifischen Di- bzw. Tetramerisierung sieht die Fusion mit zwei kurzen Bindepeptiden vor, die einander spezifisch binden (Abbildung 85). Für die Tetramerisierung wird ein VHH-Antikörper (VHH#1) als Fc-Fusion exprimiert, der zusätzlich ein C-terminales Bindepeptid trägt (Abbildung 85, links). Hierfür wurde eine kurze Lysin-reiche  $\alpha$ -Helix (KCoil <sup>[24], [221], [222]</sup>) vorgesehen. Die Fc-Fusion erzeugt hier bereits eine monospezifische Dimerisierung. Ein weiterer VHH-Antikörper mit einer anderen Spezifität (VHH#2) wird als Fusion mit dem Widerpart des KCoils, dem Glutamat-reichen ECoil <sup>[24], [221], [222]</sup> exprimiert. Die Interaktion zwischen KCoil und ECoil ermöglicht somit die Bindung zweier VHH#2 durch das VHH-Fc-Dimer. Für die Dimerisierung würden beide VHHs (VHH#1 und VHH#2) als Fusion mit KCoil bzw. ECoil und ohne die Verwendung eines Fc-Fragments exprimiert (Abbildung 85, rechts).

VHH Tetramer Fc-Fusion

VHH Dimer

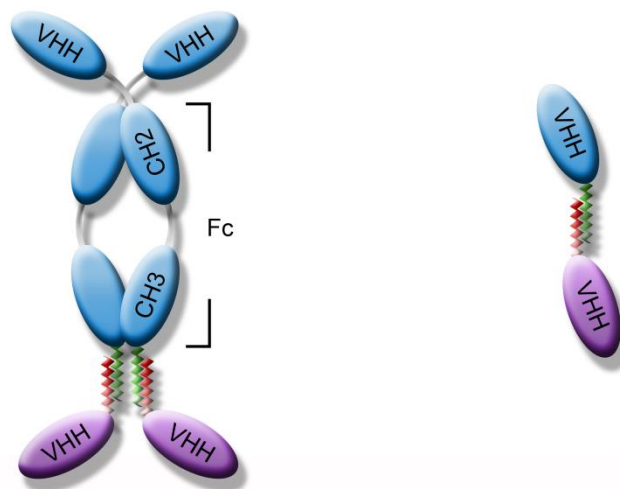


Abbildung 85: Strategie zur Di- und Tetramerisierung von VHH-Antikörpern. **Tetramerisierung** (links): VHHs#1 (blau) als Fc-Fusion mit C-terminalem Bindepeptid (KCoil/grüne Helix). VHH#2 (violett) mit C-terminalem Bindepeptid (ECoil/rote Helix). **Dimerisierung** (rechts): VHHs#1 (blau) und VHHs#2 (violett) sind nur mit C-terminalen Bindepeptiden (grüne bzw. rote Helices) fusioniert (ohne Fc-Fusion).



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] R. C. Roovers, T. Laeremans, L. Huang, S. De Taeye, A. J. Verkleij, H. Revets, H. J. de Haard, and P. M. van Bergen en Henegouwen, "Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 56, no. 3, pp. 303–317, 2007.
- [2] J. Paredes, A. L. Correia, A. S. Ribeiro, A. Albergaria, F. Milanezi, and F. C. Schmitt, "P-cadherin expression in breast cancer: a review," *Breast Cancer Res*, vol. 9, no. 5, p. 214, 2007.
- [3] N. I. Herath and A. W. Boyd, "The role of Eph receptors and ephrin ligands in colorectal cancer," *Int J Cancer*, vol. 126, no. 9, pp. 2003–2011, 2010.
- [4] A. Katayama, M. Takahara, K. Kishibe, T. Nagato, I. Kunibe, A. Katada, T. Hayashi, and Y. Harabuchi, "Expression of B7-H3 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis," *Int J Oncol*, vol. 38, no. 5, pp. 1219–1226, 2011.
- [5] M. A. Okulate, D. E. Kalume, R. Reddy, T. Kristiansen, M. Bhattacharyya, R. Chaerkady, A. Pandey, and N. Kumar, "Identification and molecular characterization of a novel protein Saglin as a target of monoclonal antibodies affecting salivary gland infectivity of Plasmodium sporozoites," *Insect Mol Biol*, vol. 16, no. 6, pp. 711–722, 2007.
- [6] S. Grau, P. J. Richards, B. Kerr, C. Hughes, B. Caterson, A. S. Williams, U. Junker, S. A. Jones, T. Clausen, and M. Ehrmann, "The role of human HtrA1 in arthritic disease," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 10, pp. 6124–6129, 2006.
- [7] L. Huang, S. Muyldermans, and D. Saerens, "Nanobodies(R): proficient tools in diagnostics," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 10, no. 6, pp. 777–785, 2010.
- [8] S. Zielonka, "Über die Identifizierung der genetischen Information der variablen Domäne des Novel Antigen Receptors (IgNAR) von *Scyliorhinus canicula*," TU-Darmstadt, Darmstadt, 2011.
- [9] K. H. Roux, A. S. Greenberg, L. Greene, L. Strelets, D. Avila, E. C. McKinney, and M. F. Flajnik, "Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 20, pp. 11804–11809, 1998.
- [10] H. Dooley and M. F. Flajnik, "Antibody repertoire development in cartilaginous fish," *Dev Comp Immunol*, vol. 30, no. 1–2, pp. 43–56, 2006.
- [11] B. J. Fennell, A. Darmanin-Sheehan, S. E. Hufton, V. Calabro, L. Wu, M. R. Muller, W. Cao, D. Gill, O. Cunningham, and W. J. Finlay, "Dissection of the IgNAR V domain: molecular scanning and orthologue database mining define novel IgNAR hallmarks and affinity maturation mechanisms," *J Mol Biol*, vol. 400, no. 2, pp. 155–170, 2010.
- [12] C. Barelle, D. S. Gill, and K. Charlton, "Shark novel antigen receptors--the next generation of biologic therapeutics?," *Adv Exp Med Biol*, vol. 655, pp. 49–62, 2009.

- 
- [13] J. L. Liu, G. P. Anderson, J. B. Delehanty, R. Baumann, A. Hayhurst, and E. R. Goldman, "Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naive shark library," *Mol Immunol*, vol. 44, no. 7, pp. 1775–1783, 2007.
- [14] H. Kolmar, "Haientikörper für die Tumordiagnose / 13 Kleingefleckte Katzenhaie," Darmstadt, 2011.
- [15] K. Uhland, "Matriptase and its putative role in cancer.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, pp. 2968–2978, 2006.
- [16] G. Sardana, B. Dowell, and E. P. Diamandis, "Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer," *Clinical Chemistry*, vol. 54, pp. 1951–1960, 2008.
- [17] H. Dooley and M. F. Flajnik, "Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*," *Eur J Immunol*, vol. 35, no. 3, pp. 936–945, 2005.
- [18] H. Kolmar, "Gewinnung von Vollblut und lymphatischen Geweben von Bambushaien / an mx 2 Bambushaien (*Chiloscyllium plagiosum*)," Darmstadt, 2011.
- [19] S. Zielonka, N. Weber, S. Becker, A. Doerner, A. Christmann, C. Christmann, C. Uth, J. Fritz, E. Schäfer, B. Steinmann, M. Empting, P. Ockelmann, M. Lierz, and H. Kolmar, "Shark Attack: High affinity binding proteins derived from shark vNAR domains by stepwise in vitro affinity maturation," *Journal of Biotechnology*, 2014.
- [20] B. Steinmann, "Intrazelluläre Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche von Protein-Einschlusskörpern," TU-Darmstadt, Darmstadt, 2009.
- [21] F. Maaß, "In vivo Immobilisierung von Enzymen und deren Einsatz für gekoppelte Enzymreaktionen von biotechnologischer Relevanz," TU-Darmstadt, Darmstadt, 2010.
- [22] N. J. Turner, "Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis," *Trends Biotechnol*, vol. 21, no. 11, pp. 474–478, 2003.
- [23] F. Escalettes and N. J. Turner, "Directed evolution of galactose oxidase: generation of enantioselective secondary alcohol oxidases," *ChemBiochem*, vol. 9, no. 6, pp. 857–860, 2008.
- [24] B. Steinmann, A. Christmann, T. Heiseler, J. Fritz, and H. Kolmar, "In vivo enzyme immobilization by inclusion body display," *Appl Env. Microbiol*, vol. 76, no. 16, pp. 5563–5569, 2010.
- [25] S. Fabritz, F. Maass, O. Avrutina, T. Heiseler, B. Steinmann, and H. Kolmar, "A sensitive method for rapid detection of alkyl halides and dehalogenase activity using a multistep enzyme assay," *AMB Express*, vol. 2, no. 1, p. 51, 2012.
- [26] G. Kohler and C. Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, 1975.
- [27] J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2010," *MAbs*, vol. 2, no. 1, pp. 84–100, 2010.

- 
- [28] B. Munos, "Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 8, no. 12, pp. 959–968, 2009.
- [29] A. D. Lawson, "Antibody-enabled small-molecule drug discovery," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 11, no. 7, pp. 519–525, 2012.
- [30] R. A. Beckman, L. M. Weiner, and H. M. Davis, "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors," *Cancer*, vol. 109, no. 2, pp. 170–179, 2007.
- [31] J. K. Tunggal, D. S. Cowan, H. Shaikh, and I. F. Tannock, "Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors," *Clin Cancer Res*, vol. 5, no. 6, pp. 1583–1586, 1999.
- [32] L. J. Nugent and R. K. Jain, "Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues," *Cancer Res*, vol. 44, no. 1, pp. 238–244, 1984.
- [33] M. A. Clauss and R. K. Jain, "Interstitial transport of rabbit and sheep antibodies in normal and neoplastic tissues," *Cancer Res*, vol. 50, no. 12, pp. 3487–3492, 1990.
- [34] A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan, T. D. McKee, T. Gohongi, E. di Tomaso, E. B. Brown, Y. Izumi, R. B. Campbell, D. A. Berk, and R. K. Jain, "Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 8, pp. 4628–4633, 2001.
- [35] H. R. Hoogenboom, "Selecting and screening recombinant antibody libraries," *Nat Biotechnol*, vol. 23, no. 9, pp. 1105–1116, 2005.
- [36] D. Saerens, G. H. Ghassebeh, and S. Muyldermans, "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 8, no. 5, pp. 600–608, 2008.
- [37] P. A. Barthelemy, H. Raab, B. A. Appleton, C. J. Bond, P. Wu, C. Wiesmann, and S. S. Sidhu, "Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 6, pp. 3639–3654, 2008.
- [38] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, and R. A. Lerner, "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda," *Science (80-. )*, vol. 246, no. 4935, pp. 1275–1281, 1989.
- [39] E. S. Ward, D. Gussow, A. D. Griffiths, P. T. Jones, and G. Winter, "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*," *Nature*, vol. 341, no. 6242, pp. 544–546, 1989.
- [40] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, and D. J. Chiswell, "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains," *Nature*, vol. 348, no. 6301, pp. 552–554, 1990.
-

- 
- [41] T. Clackson, H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, and G. Winter, "Making antibody fragments using phage display libraries," *Nature*, vol. 352, no. 6336, pp. 624–628, 1991.
- [42] J. D. Marks, H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, and G. Winter, "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage," *J Mol Biol*, vol. 222, no. 3, pp. 581–597, 1991.
- [43] D. R. Burton, C. F. Barbas 3rd, M. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock, and R. A. Lerner, "A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 22, pp. 10134–10137, 1991.
- [44] S. Muyldermans, C. Cambillau, and L. Wyns, "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains," *Trends Biochem Sci*, vol. 26, no. 4, pp. 230–235, 2001.
- [45] J. Wesolowski, V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V Serreze, F. A. Goldbaum, F. Haag, and F. Koch-Nolte, "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity," *Med Microbiol Immunol*, vol. 198, no. 3, pp. 157–174, 2009.
- [46] S. Muyldermans, "Nanobodies: natural single-domain antibodies," *Annu Rev Biochem*, vol. 82, pp. 775–797, 2013.
- [47] V. A. Streltsov, J. N. Varghese, J. A. Carmichael, R. A. Irving, P. J. Hudson, and S. D. Nuttall, "Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 34, pp. 12444–12449, 2004.
- [48] C. Y. Shao, C. J. Secombes, and A. J. Porter, "Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library," *Mol Immunol*, vol. 44, no. 4, pp. 656–665, 2007.
- [49] B. B. Haab, M. J. Dunham, and P. O. Brown, "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions," *Genome Biol*, vol. 2, no. 2, p. RESEARCH0004, 2001.
- [50] A. Desmyter, T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M. H. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyldermans, and L. Wyns, "Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme," *Nat Struct Biol*, vol. 3, no. 9, pp. 803–811, 1996.
- [51] R. Chakravarty, S. Goel, and W. Cai, "Nanobody: the 'magic bullet' for molecular imaging?," *Theranostics*, vol. 4, no. 4, pp. 386–398, 2014.
- [52] A. Chopra, "[99mTc]Epidermal growth factor receptor-specific nanobody," 2004.
- [53] L. O. Gainkam, L. Huang, V. Caveliers, M. Keyaerts, S. Hernot, I. Vaneycken, C. Vanhove, H. Revets, P. De Baetselier, and T. Lahoutte, "Comparison of the

- biodistribution and tumor targeting of two  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT,” *J Nucl Med*, vol. 49, no. 5, pp. 788–795, 2008.
- [54] T. Murphy Walport, *Janeway Immunologie*, vol. 7. Auflage. 2009.
- [55] M. A. Calcott and H. J. Muller-Eberhard, “C1q protein of human complement,” *Biochemistry*, vol. 11, no. 18, pp. 3443–3450, 1972.
- [56] E. A. Padlan, “Anatomy of the antibody molecule,” *Mol Immunol*, vol. 31, no. 3, pp. 169–217, 1994.
- [57] P. M. Kirkham, F. Mortari, J. A. Newton, and H. W. Schroeder Jr., “Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding,” *EMBO J*, vol. 11, no. 2, pp. 603–609, 1992.
- [58] M. F. Flajnik, N. Deschacht, and S. Muyldermans, “A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?,” *PLoS Biol*, vol. 9, no. 8, p. e1001120, 2011.
- [59] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers, “Naturally occurring antibodies devoid of light chains,” *Nature*, vol. 363, no. 6428, pp. 446–448, 1993.
- [60] A. S. Greenberg, D. Avila, M. Hughes, A. Hughes, E. C. McKinney, and M. F. Flajnik, “A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks,” *Nature*, vol. 374, no. 6518, pp. 168–173, 1995.
- [61] V. K. Nguyen, C. Su, S. Muyldermans, and W. van der Loo, “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” *Immunogenetics*, vol. 54, no. 1, pp. 39–47, 2002.
- [62] K. E. Conrath, U. Wernery, S. Muyldermans, and V. K. Nguyen, “Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae,” *Dev Comp Immunol*, vol. 27, no. 2, pp. 87–103, 2003.
- [63] M. F. Criscitiello, M. Saltis, and M. F. Flajnik, “An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: doubly rearranging NAR-TcR genes in sharks,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 13, pp. 5036–5041, 2006.
- [64] M. F. Flajnik and M. Kasahara, “Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures,” *Nat Rev Genet*, vol. 11, no. 1, pp. 47–59, 2010.
- [65] M. R. Hurle, L. R. Helms, L. Li, W. Chan, and R. Wetzell, “A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 12, pp. 5446–5450, 1994.
- [66] M. Lauwereys, M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, J. Kinne, W. Holzer, E. De Genst, L. Wyns, and S. Muyldermans, “Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies,” *EMBO J*, vol. 17, no. 13, pp. 3512–3520, 1998.

- 
- [67] E. De Genst, K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans, and L. Wyns, "Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 12, pp. 4586–4591, 2006.
- [68] R. L. Stanfield, H. Dooley, P. Verdino, M. F. Flajnik, and I. A. Wilson, "Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding," *J Mol Biol*, vol. 367, no. 2, pp. 358–372, 2007.
- [69] M. Ghassabeh and Saerens, "Nanobodies, Single-Domain Antigen-Binding Fragments of Camelid Heavy-Chain Antibodies," in *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, vol. 11, W. G. S. J. Shire K. Bechtold-Peters, and J. Andya, Ed. Springer New York, 2010.
- [70] J. A. Kolkman and D. A. Law, "Nanobodies - From llamas to therapeutic proteins," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 7. 2010.
- [71] T. De Meyer, S. Muyldermans, and A. Depicker, "Nanobody-based products as research and diagnostic tools," *Trends Biotechnol*, vol. 32, no. 5, pp. 263–270, 2014.
- [72] M. D. Cooper and M. N. Alder, "The evolution of adaptive immune systems," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 815–822, 2006.
- [73] M. J. Feige, M. A. Grawert, M. Marcinowski, J. Hennig, J. Behnke, D. Auslander, E. M. Herold, J. Peschek, C. D. Castro, M. Flajnik, L. M. Hendershot, M. Sattler, M. Groll, and J. Buchner, "The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 22, pp. 8155–8160, 2014.
- [74] J. L. England and G. Haran, "Role of solvation effects in protein denaturation: from thermodynamics to single molecules and back," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 62, pp. 257–277, 2011.
- [75] R. L. Stanfield, H. Dooley, M. F. Flajnik, and I. A. Wilson, "Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme," *Science (80-. )*, vol. 305, no. 5691, pp. 1770–1773, 2004.
- [76] D. R. Maass, J. Sepulveda, A. Pernthaner, and C. B. Shoemaker, "Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs)," *J Immunol Methods*, vol. 324, no. 1–2, pp. 13–25, 2007.
- [77] V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, and S. Muyldermans, "Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies," *Mol Immunol*, vol. 36, no. 8, pp. 515–524, 1999.
- [78] B. P. Woolven, L. G. Frenken, P. van der Logt, and P. J. Nicholls, "The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation," *Immunogenetics*, vol. 50, no. 1–2, pp. 98–101, 1999.



- 
- [79] A. Desmyter, K. Decanniere, S. Muyldermans, and L. Wyns, "Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 28, pp. 26285–26290, 2001.
- [80] J. Davies and L. Riechmann, "'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains," *FEBS Lett*, vol. 339, no. 3, pp. 285–290, 1994.
- [81] C. Vincke, R. Loris, D. Saerens, S. Martinez-Rodriguez, S. Muyldermans, and K. Conrath, "General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 5, pp. 3273–3284, 2009.
- [82] V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, and S. Muyldermans, "Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire," *EMBO J*, vol. 19, no. 5, pp. 921–930, 2000.
- [83] K. Conrath, C. Vincke, B. Stijlemans, J. Schymkowitz, K. Decanniere, L. Wyns, S. Muyldermans, and R. Loris, "Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH," *J Mol Biol*, vol. 350, no. 1, pp. 112–125, 2005.
- [84] T. T. Wu, G. Johnson, and E. A. Kabat, "Length distribution of CDRH3 in antibodies," *Proteins*, vol. 16, no. 1, pp. 1–7, 1993.
- [85] S. Muyldermans, T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. Barbosa, and R. Hamers, "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains," *Protein Eng*, vol. 7, no. 9, pp. 1129–1135, 1994.
- [86] S. G. Rasmussen, H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis, and B. K. Kobilka, "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor," *Nature*, vol. 469, no. 7329, pp. 175–180, 2011.
- [87] K. B. Vu, M. A. Ghahroudi, L. Wyns, and S. Muyldermans, "Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies," *Mol Immunol*, vol. 34, no. 16–17, pp. 1121–1131, 1997.
- [88] M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, I. J. Nijman, T. A. Niewold, L. G. Frenken, and B. de Geus, "Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features," *Mol Immunol*, vol. 37, no. 10, pp. 579–590, 2000.
- [89] K. De Groeve, N. Deschacht, C. De Koninck, V. Caveliers, T. Lahoutte, N. Devoogdt, S. Muyldermans, P. De Baetselier, and G. Raes, "Nanobodies as tools for in vivo imaging of specific immune cell types," *J Nucl Med*, vol. 51, no. 5, pp. 782–789, 2010.
- [90] I. Vaneycken, J. Govaert, C. Vincke, V. Caveliers, T. Lahoutte, P. De Baetselier, G. Raes, A. Bossuyt, S. Muyldermans, and N. Devoogdt, "In vitro analysis and in vivo tumor targeting of a humanized, grafted nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT," *J Nucl Med*, vol. 51, no. 7, pp. 1099–1106, 2010.
-



- 
- [91] B. M. Tijink, T. Laeremans, M. Budde, M. Stigter-van Walsum, T. Dreier, H. J. de Haard, C. R. Leemans, and G. A. van Dongen, "Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology," *Mol Cancer Ther*, vol. 7, no. 8, pp. 2288–2297, 2008.
- [92] L. Huang, L. O. Gainkam, V. Caveliers, C. Vanhove, M. Keyaerts, P. De Baetselier, A. Bossuyt, H. Revets, and T. Lahoutte, "SPECT imaging with  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression," *Mol Imaging Biol*, vol. 10, no. 3, pp. 167–175, 2008.
- [93] M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, and S. Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies," *FEBS Lett*, vol. 414, no. 3, pp. 521–526, 1997.
- [94] R. H. van der Linden, B. de Geus, G. J. Frenken, H. Peters, and C. T. Verrips, "Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution," *J Biotechnol*, vol. 80, no. 3, pp. 261–270, 2000.
- [95] E. R. Goldman, G. P. Anderson, J. L. Liu, J. B. Delehanty, L. J. Sherwood, L. E. Osborn, L. B. Cummins, and A. Hayhurst, "Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library," *Anal Chem*, vol. 78, no. 24, pp. 8245–8255, 2006.
- [96] R. C. Ladenson, D. L. Crimmins, Y. Landt, and J. H. Ladenson, "Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment," *Anal Chem*, vol. 78, no. 13, pp. 4501–4508, 2006.
- [97] J. M. Perez, J. G. Renisio, J. J. Prompers, C. J. van Platerink, C. Cambillau, H. Darbon, and L. G. Frenken, "Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process," *Biochemistry*, vol. 40, no. 1, pp. 74–83, 2001.
- [98] S. Ewert, C. Cambillau, K. Conrath, and A. Pluckthun, "Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains," *Biochemistry*, vol. 41, no. 11, pp. 3628–3636, 2002.
- [99] M. Dumoulin, K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L. G. Frenken, S. Muyldermans, L. Wyns, and A. Matagne, "Single-domain antibody fragments with high conformational stability," *Protein Sci*, vol. 11, no. 3, pp. 500–515, 2002.
- [100] J. Davies and L. Riechmann, "Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability," *Protein Eng*, vol. 9, no. 6, pp. 531–537, 1996.
- [101] S. Muyldermans, T. N. Baral, V. C. Retamozzo, P. De Baetselier, E. De Genst, J. Kinne, H. Leonhardt, S. Magez, V. K. Nguyen, H. Revets, U. Rothbauer, B. Stijlemans, S. Tillib, U. Wernery, L. Wyns, G. Hassanzadeh-Ghassabeh, and D. Saerens, "Camelid immunoglobulins and nanobody technology," *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 128, no. 1–3, pp. 178–183, 2009.
-

- 
- [102] U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso, and H. Leonhardt, "A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins," *Mol Cell Proteomics*, vol. 7, no. 2, pp. 282–289, 2008.
- [103] S. Spinelli, L. G. Frenken, P. Hermans, T. Verrips, K. Brown, M. Tegoni, and C. Cambillau, "Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens," *Biochemistry*, vol. 39, no. 6, pp. 1217–1222, 2000.
- [104] V. Cortez-Retamozo, N. Backmann, P. D. Senter, U. Wernery, P. De Baetselier, S. Muyldermans, and H. Revets, "Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate," *Cancer Res*, vol. 64, no. 8, pp. 2853–2857, 2004.
- [105] D. Saerens, J. Kinne, E. Bosmans, U. Wernery, S. Muyldermans, and K. Conrath, "Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 50, pp. 51965–51972, 2004.
- [106] J. J. Hulstein, P. G. de Groot, K. Silence, A. Veyradier, R. Fijnheer, and P. J. Lenting, "A novel nanobody that detects the gain-of-function phenotype of von Willebrand factor in ADAMTS13 deficiency and von Willebrand disease type 2B," *Blood*, vol. 106, no. 9, pp. 3035–3042, 2005.
- [107] R. Klooster, B. T. Maassen, J. C. Stam, P. W. Hermans, M. R. Ten Haaf, F. J. Detmers, H. J. de Haard, J. A. Post, and C. Theo Verrips, "Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology," *J Immunol Methods*, vol. 324, no. 1–2, pp. 1–12, 2007.
- [108] J. Tanha, P. Xu, Z. Chen, F. Ni, H. Kaplan, S. A. Narang, and C. R. MacKenzie, "Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 27, pp. 24774–24780, 2001.
- [109] K. Y. Yau, M. A. Groves, S. Li, C. Sheedy, H. Lee, J. Tanha, C. R. MacKenzie, L. Jermutus, and J. C. Hall, "Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library," *J Immunol Methods*, vol. 281, no. 1–2, pp. 161–175, 2003.
- [110] A. J. Groot, P. Verheesen, E. J. Westerlaken, E. H. Gort, P. van der Groep, N. Bovenschen, E. van der Wall, P. J. van Diest, and A. Shvarts, "Identification by phage display of single-domain antibody fragments specific for the ODD domain in hypoxia-inducible factor 1alpha," *Lab Invest*, vol. 86, no. 4, pp. 345–356, 2006.
- [111] C. S. Stewart, C. R. MacKenzie, and J. C. Hall, "Isolation, characterization and pentamerization of alpha-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naive phage display library: preliminary findings for antivenom development," *Toxicon*, vol. 49, no. 5, pp. 699–709, 2007.
- [112] K. Y. Yau, G. Dubuc, S. Li, T. Hiram, C. R. Mackenzie, L. Jermutus, J. C. Hall, and J. Tanha, "Affinity maturation of a V(H)H by mutational hotspot randomization," *J Immunol Methods*, vol. 297, no. 1–2, pp. 213–224, 2005.
-

- 
- [113] P. Vanlandschoot, C. Stortelers, E. Beirnaert, L. I. Ibanez, B. Schepens, E. Depla, and X. Saelens, "Nanobodies(R): new ammunition to battle viruses," *Antivir. Res.*, vol. 92, no. 3, pp. 389–407, 2011.
- [114] A. Abulrob, H. Sprong, P. Van Bergen en Henegouwen, and D. Stanimirovic, "The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells," *J Neurochem*, vol. 95, no. 4, pp. 1201–1214, 2005.
- [115] A. Muruganandam, J. Tanha, S. Narang, and D. Stanimirovic, "Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium," *FASEB J*, vol. 16, no. 2, pp. 240–242, 2002.
- [116] L. G. Frenken, R. H. van der Linden, P. W. Hermans, J. W. Bos, R. C. Ruuls, B. de Geus, and C. T. Verrips, "Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*," *J Biotechnol*, vol. 78, no. 1, pp. 11–21, 2000.
- [117] A. Hultberg, N. J. Temperton, V. Rosseels, M. Koenders, M. Gonzalez-Pajuelo, B. Schepens, L. I. Ibanez, P. Vanlandschoot, J. Schillemans, M. Saunders, R. A. Weiss, X. Saelens, J. A. Melero, C. T. Verrips, S. Van Gucht, and H. J. de Haard, "Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules," *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e17665, 2011.
- [118] L. M. Zarebski, M. Urrutia, and F. A. Goldbaum, "Llama single domain antibodies as a tool for molecular mimicry," *J Mol Biol*, vol. 349, no. 4, pp. 814–824, 2005.
- [119] K. Omidfar, M. J. Rasaei, H. Modjtahedi, M. Forouzandeh, M. Taghikhani, and N. Golmakani, "Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR," *Tumour Biol*, vol. 25, no. 5–6, pp. 296–305, 2004.
- [120] E. B. Gottlin, G. Xiangrong, C. Pegram, A. Cannedy, M. J. Campa, and E. F. Patz Jr., "Isolation of novel EGFR-specific VHH domains," *J Biomol Screen*, vol. 14, no. 1, pp. 77–85, 2009.
- [121] F. Van Bockstaele, J. B. Holz, and H. Revets, "The development of nanobodies for therapeutic applications," *Curr Opin Investig Drugs*, vol. 10, no. 11, pp. 1212–1224, 2009.
- [122] G. Winter and C. Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, vol. 349, no. 6307, pp. 293–299, 1991.
- [123] R. Orlandi, D. H. Gussow, P. T. Jones, and G. Winter, "Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, no. 10, pp. 3833–3837, 1989.
- [124] G. P. Smith, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface," *Science (80-. )*, vol. 228, no. 4705, pp. 1315–1317, 1985.

- 
- [125] H. R. Hoogenboom, "Overview of antibody phage-display technology and its applications," *Methods Mol Biol*, vol. 178, pp. 1–37, 2002.
- [126] M. C. Kieke, B. K. Cho, E. T. Boder, D. M. Kranz, and K. D. Wittrup, "Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display," *Protein Eng*, vol. 10, no. 11, pp. 1303–1310, 1997.
- [127] E. T. Boder and K. D. Wittrup, "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries," *Nat Biotechnol*, vol. 15, no. 6, pp. 553–557, 1997.
- [128] S. A. Gai and K. D. Wittrup, "Yeast surface display for protein engineering and characterization," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 17, no. 4, pp. 467–473, 2007.
- [129] L. R. Pepper, Y. K. Cho, E. T. Boder, and E. V Shusta, "A decade of yeast surface display technology: where are we now?," *Comb Chem High Throughput Screen*, vol. 11, no. 2, pp. 127–134, 2008.
- [130] W. Liu, H. Zhao, B. Jia, L. Xu, and Y. Yan, "Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein," *Biotechnol Lett*, vol. 32, no. 2, pp. 255–260, 2010.
- [131] G. D. Su, D. F. Huang, S. Y. Han, S. P. Zheng, and Y. Lin, "Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 86, no. 5, pp. 1493–1501, 2010.
- [132] G. D. Su, X. Zhang, and Y. Lin, "Surface display of active lipase in *Pichia pastoris* using Sed1 as an anchor protein," *Biotechnol Lett*, vol. 32, no. 8, pp. 1131–1136, 2010.
- [133] S. Lin, N. R. Houston-Cummings, B. Prinz, R. Moore, B. Bobrowicz, R. C. Davidson, S. Wildt, T. A. Stadheim, and D. Zha, "A novel fragment of antigen binding (Fab) surface display platform using glycoengineered *Pichia pastoris*," *J Immunol Methods*, vol. 375, no. 1–2, pp. 159–165, 2012.
- [134] T. Tanaka, R. Yamada, C. Ogino, and A. Kondo, "Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 95, no. 3, pp. 577–591, 2012.
- [135] E. T. Boder, K. S. Midelfort, and K. D. Wittrup, "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 20, pp. 10701–10705, 2000.
- [136] A. R. Bradbury and J. D. Marks, "Antibodies from phage antibody libraries," *J Immunol Methods*, vol. 290, no. 1–2, pp. 29–49, 2004.
- [137] T. Kretzschmar and M. Geiser, "Evaluation of antibodies fused to minor coat protein III and major coat protein VIII of bacteriophage M13," *Gene*, vol. 155, no. 1, pp. 61–65, 1995.
- [138] H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson, and G. Winter, "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for

- displaying antibody (Fab) heavy and light chains,” *Nucleic Acids Res*, vol. 19, no. 15, pp. 4133–4137, 1991.
- [139] P. Holliger, T. Prospero, and G. Winter, “Diabodies’: small bivalent and bispecific antibody fragments,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 14, pp. 6444–6448, 1993.
- [140] P. Holliger and G. Winter, “Engineering bispecific antibodies,” *Curr Opin Biotechnol*, vol. 4, no. 4, pp. 446–449, 1993.
- [141] B. T. McGuinness, G. Walter, K. FitzGerald, P. Schuler, W. Mahoney, A. R. Duncan, and H. R. Hoogenboom, “Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments,” *Nat Biotechnol*, vol. 14, no. 9, pp. 1149–1154, 1996.
- [142] A. Todorovska, R. C. Roovers, O. Dolezal, A. A. Kortt, H. R. Hoogenboom, and P. J. Hudson, “Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting,” *J Immunol Methods*, vol. 248, no. 1–2, pp. 47–66, 2001.
- [143] Y. Mazor, T. Van Blarcom, S. Carroll, and G. Georgiou, “Selection of full-length IgGs by tandem display on filamentous phage particles and Escherichia coli fluorescence-activated cell sorting screening,” *FEBS J*, vol. 277, no. 10, pp. 2291–2303, 2010.
- [144] W. P. Yang, K. Green, S. Pinz-Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton, and C. F. Barbas 3rd, “CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range,” *J Mol Biol*, vol. 254, no. 3, pp. 392–403, 1995.
- [145] R. Schier, A. McCall, G. P. Adams, K. W. Marshall, H. Merritt, M. Yim, R. S. Crawford, L. M. Weiner, C. Marks, and J. D. Marks, “Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site,” *J Mol Biol*, vol. 263, no. 4, pp. 551–567, 1996.
- [146] D. Lu, J. Shen, M. D. Vil, H. Zhang, X. Jimenez, P. Bohlen, L. Witte, and Z. Zhu, “Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity,” *J Biol Chem*, vol. 278, no. 44, pp. 43496–43507, 2003.
- [147] G. Chao, W. L. Lau, B. J. Hackel, S. L. Sazinsky, S. M. Lippow, and K. D. Wittrup, “Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display,” *Nat Protoc*, vol. 1, no. 2, pp. 755–768, 2006.
- [148] G. Huang, M. Zhang, and S. E. Erdman, “Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesin Aga1p,” *Eukaryot Cell*, vol. 2, no. 5, pp. 1099–1114, 2003.
- [149] P. Orlan and A. K. Menon, “Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids,” *J Lipid Res*, vol. 48, no. 5, pp. 993–1011, 2007.

- 
- [150] N. Sato, T. Matsumoto, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, and A. Kondo, "Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 60, no. 4, pp. 469–474, 2002.
- [151] T. Tanino, H. Fukuda, and A. Kondo, "Construction of a *Pichia pastoris* cell-surface display system using Flo1p anchor system," *Biotechnol Prog*, vol. 22, no. 4, pp. 989–993, 2006.
- [152] Y. P. Khasa, S. Conrad, M. Sengul, S. Plautz, M. M. Meagher, and M. Inan, "Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion," *Yeast*, vol. 28, no. 3, pp. 213–226, 2011.
- [153] Q. Wang, L. Li, M. Chen, Q. Qi, and P. G. Wang, "Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*," *Biotechnol Lett*, vol. 29, no. 10, pp. 1561–1566, 2007.
- [154] M. Mergler, K. Wolf, and M. Zimmermann, "Development of a bisphenol A-adsorbing yeast by surface display of the Kluyveromyces yellow enzyme on *Pichia pastoris*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 63, no. 4, pp. 418–421, 2004.
- [155] J. L. Wasilenko, L. Sarmiento, S. Spatz, and M. Pantin-Jackwood, "Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines," *Biotechnol Prog*, vol. 26, no. 2, pp. 542–547, 2010.
- [156] A. Kondo and M. Ueda, "Yeast cell-surface display--applications of molecular display," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 64, no. 1, pp. 28–40, 2004.
- [157] E. T. Boder and K. D. Wittrup, "Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability," *Methods Enzym.*, vol. 328, pp. 430–444, 2000.
- [158] M. Johnston and R. W. Davis, "Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol Cell Biol*, vol. 4, no. 8, pp. 1440–1448, 1984.
- [159] M. A. Romanos, C. A. Scorer, and J. J. Clare, "Foreign gene expression in yeast: a review," *Yeast*, vol. 8, no. 6, pp. 423–488, 1992.
- [160] D. Maya, M. J. Quintero, M. de la Cruz Munoz-Centeno, and S. Chavez, "Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol Lett*, vol. 30, no. 6, pp. 979–987, 2008.
- [161] T. Hofmeyer, S. Schmelz, M. T. Degiacomi, M. Dal Peraro, M. Daneschdar, A. Scrima, J. van den Heuvel, D. W. Heinz, and H. Kolmar, "Arranged sevenfold: structural insights into the C-terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein," *J Mol Biol*, vol. 425, no. 8, pp. 1302–1317, 2013.
- [162] Y. S. Liu, X. Y. Luo, Q. R. Li, H. Li, C. Li, H. Ni, R. X. Li, R. Wang, H. C. Hu, Y. J. Pan, H. Q. Chen, and R. Zeng, "Shotgun and targeted proteomics reveal that pre-surgery serum levels of LRG1, SAA, and C4BP may refine prognosis of resected squamous cell lung cancer," *J Mol Cell Biol*, vol. 4, no. 5, pp. 344–347, 2012.



- 
- [163] A. K. Ghosh, M. Devenport, D. Jethwaney, D. E. Kalume, A. Pandey, V. E. Anderson, A. A. Sultan, N. Kumar, and M. Jacobs-Lorena, "Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles saglin proteins," *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 1, p. e1000265, 2009.
- [164] S. M. Huang and P. M. Harari, "Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results," *Invest New Drugs*, vol. 17, no. 3, pp. 259–269, 1999.
- [165] J. Baselga, "The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab," *Eur J Cancer*, vol. 37 Suppl 4, pp. S16–22, 2001.
- [166] E. Dunne, C. M. Spring, A. Rehemian, W. Jin, M. C. Berndt, D. K. Newman, P. J. Newman, H. Ni, and D. Kenny, "Cadherin 6 has a functional role in platelet aggregation and thrombus formation," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 32, no. 7, pp. 1724–1731, 2012.
- [167] A. Usui, S. Y. Ko, N. Barengo, and H. Naora, "P-cadherin promotes ovarian cancer dissemination through tumor cell aggregation and tumor-peritoneum interactions," *Mol Cancer Res*, vol. 12, no. 4, pp. 504–513, 2014.
- [168] F. W. Studier and B. A. Moffatt, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes," *J Mol Biol*, vol. 189, no. 1, pp. 113–130, 1986.
- [169] M. Meselson and R. Yuan, "DNA restriction enzyme from *E. coli*," *Nature*, vol. 217, no. 5134, pp. 1110–1114, 1968.
- [170] S. G. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan, "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 12, pp. 4645–4649, 1990.
- [171] G. R. Titeeva and A. Berlin Iu, "[Isolation and properties of recombinant DNA from a plasmid and filamentous phage]," *Bioorg Khim*, vol. 12, no. 1, pp. 116–123, 1986.
- [172] F. A. Gunkel and H. G. Gassen, "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*," *Eur J Biochem*, vol. 179, no. 1, pp. 185–194, 1989.
- [173] L. Yang, S. Zhu, W. Hang, L. Wu, and X. Yan, "Development of an ultrasensitive dual-channel flow cytometer for the individual analysis of nanosized particles and biomolecules," *Anal Chem*, vol. 81, no. 7, pp. 2555–2563, 2009.
- [174] M. K. Woo, C. K. Heo, H. M. Hwang, J. H. Ko, H. S. Yoo, and E. W. Cho, "Optimization of phage-immobilized ELISA for autoantibody profiling in human sera," *Biotechnol Lett*, vol. 33, no. 4, pp. 655–661, 2011.
- [175] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing, "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors," *Gene*, vol. 33, no. 1, pp. 103–119, 1985.



- 
- [176] U. Horn, W. Strittmatter, A. Krebber, U. Knupfer, M. Kujau, R. Wenderoth, K. Muller, S. Matzku, A. Pluckthun, and D. Riesenberger, "High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 46, no. 5–6, pp. 524–532, 1996.
- [177] J. A. Rakestraw, S. L. Sazinsky, A. Piatesi, E. Antipov, and K. D. Wittrup, "Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol Bioeng*, vol. 103, no. 6, pp. 1192–1201, 2009.
- [178] L. Benatuil, J. M. Perez, J. Belk, and C. M. Hsieh, "An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries," *Protein Eng Des Sel*, vol. 23, no. 4, pp. 155–159, 2010.
- [179] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [180] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, "Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench," *Bioinformatics*, vol. 25, pp. 1189–1191, 2009.
- [181] T. Carver and A. Bleasby, "The design of Jemboss: a graphical user interface to EMBOSS," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 14, pp. 1837–1843, 2003.
- [182] P. A. Sharp, B. Sugden, and J. Sambrook, "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis," *Biochemistry*, vol. 12, no. 16, pp. 3055–3063, 1973.
- [183] Q. Huang and W. L. Fu, "Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis," *Clin Chem Lab Med*, vol. 43, no. 8, pp. 841–842, 2005.
- [184] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim, "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," *Science (80-. )*, vol. 230, no. 4732, pp. 1350–1354, 1985.
- [185] K. B. Mullis and F. A. Faloona, "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction," *Methods Enzym.*, vol. 155, pp. 335–350, 1987.
- [186] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science (80-. )*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988.
- [187] S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease, "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction," *Gene*, vol. 77, no. 1, pp. 51–59, 1989.

- 
- [188] A. N. Warrens, M. D. Jones, and R. I. Lechler, "Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest," *Gene*, vol. 186, no. 1, pp. 29–35, 1997.
- [189] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray, "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein," *Protein Sci*, vol. 4, no. 11, pp. 2411–2423, 1995.
- [190] H. Schagger, "Tricine-SDS-PAGE," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 1, pp. 16–22, 2006.
- [191] T. S. Meyer and B. L. Lamberts, "Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips," *Biochim Biophys Acta*, vol. 107, no. 1, pp. 144–145, 1965.
- [192] J. Renart, J. Reiser, and G. R. Stark, "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no. 7, pp. 3116–3120, 1979.
- [193] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [194] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation," *Nature*, vol. 258, no. 5536, pp. 598–599, 1975.
- [195] J. Porath, B. Olin, and B. Granstrand, "Immobilized-metal affinity chromatography of serum proteins on gel-immobilized group III A metal ions," *Arch Biochem Biophys*, vol. 225, no. 2, pp. 543–547, 1983.
- [196] J. Porath and B. Olin, "Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions," *Biochemistry*, vol. 22, no. 7, pp. 1621–1630, 1983.
- [197] J. L. Wilson, I. M. Scott, and J. L. McMurry, "Optical biosensing: Kinetics of protein A-IGG binding using biolayer interferometry," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 38, no. 6, pp. 400–7, Nov. 2010.
- [198] A. Monegal, D. Ami, C. Martinelli, H. Huang, M. Aliprandi, P. Capasso, C. Francavilla, G. Ossolengo, and A. de Marco, "Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library," *Protein Eng Des Sel*, vol. 22, no. 4, pp. 273–280, 2009.
- [199] V. Schroeder and H. P. Kohler, "New developments in the area of factor XIII," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 11, pp. 234–244, 2013.
- [200] R. Sengupta and A. Holmgren, "Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase," *World J. Biol. Chem.*, vol. 5, pp. 68–74, 2014.

- 
- [201] T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, and R. J. Rothstein, "Yeast transformation: a model system for the study of recombination," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 78, no. 10, pp. 6354–6358, 1981.
- [202] T. L. Orr-Weaver and J. W. Szostak, "Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 80, no. 14, pp. 4417–4421, 1983.
- [203] H. Ma, S. Kunes, P. J. Schatz, and D. Botstein, "Plasmid construction by homologous recombination in yeast," *Gene*, vol. 58, no. 2–3, pp. 201–216, 1987.
- [204] J. Y. Wong, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, N. Mullah, and S. Zalipsky, "Direct measurement of a tethered ligand-receptor interaction potential," *Science*, vol. 275, pp. 820–822, 1997.
- [205] L. T. Boni, T. P. Stewart, J. L. Alderfer, and S. W. Hui, "Lipid-polyethylene glycol interactions: I. Induction of fusion between liposomes," *J. Membr. Biol.*, vol. 62, pp. 65–70, 1981.
- [206] L. T. Boni, T. P. Stewart, J. L. Alderfer, and S. W. Hui, "Lipid-polyethylene glycol interactions: II. Formation of defects in bilayers," *J. Membr. Biol.*, vol. 62, pp. 71–77, 1981.
- [207] E. T. Boder, M. Raeeszadeh-Sarmazdeh, and J. V Price, "Engineering antibodies by yeast display," *Arch Biochem Biophys*, vol. 526, no. 2, pp. 99–106, 2012.
- [208] L. Riehl, "Nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von Antikörpern auf Hefezellen," TU-Darmstadt, Darmstadt, 2013.
- [209] P. Seto, "Kinetics on the Octet Systems: What Lies Beneath the Curves," 2012.
- [210] Y. Liu, P. Estep, F. Reid, Y. Cao, T. Sun, Y. Yu, I. Caffry, and A. Xu, Yingda (Protein Analytic, "Picomolar Solution Phase Affinity Measurement by BLI-ELISA," *Interactions, fortéBIO*, 2014. [Online]. Available: [http://www.fortebio.com/interactions/Winter\\_2014/index6.html](http://www.fortebio.com/interactions/Winter_2014/index6.html).
- [211] P. Verheesen, A. Roussis, H. J. de Haard, A. J. Groot, J. C. Stam, J. T. den Dunnen, R. R. Frants, A. J. Verkleij, C. Theo Verrips, and S. M. van der Maarel, "Reliable and controllable antibody fragment selections from Camelid non-immune libraries for target validation," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1764, no. 8, pp. 1307–1319, 2006.
- [212] G. H. Shaker and N. A. Melake, "Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies," *Saudi Pharm. J.*, vol. 20, pp. 221–227, 2012.
- [213] K. Winterling, "Durchmusterung einer VHH-Antikörperbibliothek eines immunisierten Lamas und Produktion von VHHs in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*," TU-Darmstadt, Darmstadt, 2012.

- 
- [214] D. P. Simmons, F. A. Abregu, U. V Krishnan, D. F. Proll, V. A. Streltsov, L. Doughty, M. K. Hattarki, and S. D. Nuttall, "Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments," *J Immunol Methods*, vol. 315, no. 1–2, pp. 171–184, 2006.
- [215] I. Hmila, R. B. Abdallah, D. Saerens, Z. Benlasfar, K. Conrath, M. E. Ayeb, S. Muyldermans, and B. Bouhaouala-Zahar, "VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI," *Mol Immunol*, vol. 45, no. 14, pp. 3847–3856, 2008.
- [216] R. W. Strube and S. Y. Chen, "Enhanced intracellular stability of sFv-Fc fusion intrabodies," *Methods*, vol. 34, no. 2, pp. 179–183, 2004.
- [217] M. Muda, A. W. Gross, J. P. Dawson, C. He, E. Kurosawa, R. Schweickhardt, M. Dugas, M. Soloviev, A. Bernhardt, D. Fischer, J. S. Wesolowski, C. Kelton, B. Neuteboom, and B. Hock, "Therapeutic assessment of SEED: a new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific antibodies," *Protein Eng Des Sel*, vol. 24, no. 5, pp. 447–454, 2011.
- [218] G. Romain, V. Senyukov, N. Rey-Villamizar, A. Merouane, W. Kelton, I. Liadi, A. Mahendra, W. Charab, G. Georgiou, B. Roysam, D. A. Lee, and N. Varadarajan, "Antibody Fc-engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells," *Blood*, 2014.
- [219] A. S. Robinson, V. Hines, and K. D. Wittrup, "Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. (N Y)*, vol. 12, no. 4, pp. 381–384, 1994.
- [220] L. K. Pattenden and W. G. Thomas, "Amylose affinity chromatography of maltose-binding protein: purification by both native and novel matrix-assisted dialysis refolding methods," *Methods Mol Biol*, vol. 421, pp. 169–189, 2008.
- [221] H. Chao, M. E. Houston, S. Grothe, C. M. Kay, M. O'Connor-McCourt, R. T. Irvin, and R. S. Hodges, "Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: Use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 12175–12185, 1996.
- [222] B. Tripet, L. Yu, D. L. Bautista, W. Y. Wong, R. T. Irvin, and R. S. Hodges, "Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins," *Protein Eng.*, vol. 9, pp. 1029–1042, 1996.

---

Darmstadt, den 12. Februar 2015

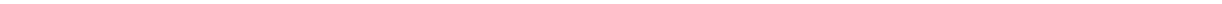
## **Eidesstattliche Erklärung**


Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

Dipl. Biol. Björn Steinmann

---





---

Darmstadt, den 12. Februar 2015

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

Dipl. Biol. Björn Steinmann

---





---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten:

Name: Dipl. Biol. **Björn Steinmann**  
Geburt: 14.05.1980, Weinheim  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: Ledig  
E-Mail: steinmann@biochemie-tud.de

---

### Beruflicher Werdegang:

Seit 09.2012 **Wissenschaftler** bei Bayer HealthCare AG, Abteilung: Antibody Lead Discovery, Köln.

---

### Akademischer Werdegang:

07.2009 bis 08.2012 **Promotion** am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Kolmar. Titel der Dissertation:

*„Isolierung und Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern durch mikrobielle Oberflächenpräsentation molekularer Bibliotheken“.*

10.2001 bis 06.2009 **Diplomstudium in Biologie** an der Technischen Universität Darmstadt. Unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Kolmar. Titel der Diplomarbeit:

*„Intrazelluläre Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche von Protein-Einschlusskörpern“.*

---

### Schulbildung:

1991-2000 Altes Kurfürstliches Gymnasium, Bensheim  
Abschluss: Abitur

1987 bis 1991 Märkerwaldschule Gronau, Bensheim-Gronau

---

Dipl. Biol. Björn Steinmann



